

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización electrofisiológica de la fibrilación y la  
insuficiencia cardiaca mediante análisis de espacio,  
tiempo y frecuencia de potenciales cardiacos eléctricos  
y ópticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Jorge García Quintanilla**

DIRECTORES

**Javier Moreno Planas  
Julián Pérez-Villacastín  
Carlos Macaya Miguel**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Departamento de Medicina



CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LA  
FIBRILACIÓN Y LA INSUFICIENCIA CARDIACA  
MEDIANTE ANÁLISIS EN ESPACIO, TIEMPO Y  
FRECUENCIA DE POTENCIALES CARDIACOS  
ELÉCTRICOS Y ÓPTICOS

**JORGE GARCÍA QUINTANILLA**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**JAVIER MORENO PLANAS**

Doctor en Medicina. Jefe de la Unidad de Arritmias  
del Hospital Ramón y Cajal

**JULIÁN PÉREZ-VILLACASTÍN**

Doctor en Medicina. Jefe de la Unidad de Arritmias  
y Director del Instituto Cardiovascular del Hospital  
Clínico San Carlos. Profesor Asociado de la  
Universidad Complutense de Madrid

**CARLOS MACAYA MIGUEL**

Doctor en Medicina. Jefe de Servicio de Cardiología  
del Hospital Clínico San Carlos. Catedrático de la  
Universidad Complutense de Madrid

**Madrid, 2015**



## UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

### INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Dr. Javier Moreno Planas, Jefe de la Unidad de Arritmias del Hospital Ramón y Cajal, Dr. Julián Pérez-Villacastín, Jefe de la Unidad de Arritmias y Director del Instituto Cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y Profesor Asociado de la Universidad Complutense de Madrid, y Dr. Carlos Macaya Miguel, Jefe de Servicio de Cardiología del Hospital Clínico San Carlos y Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid, certifican:

Que Don Jorge García Quintanilla, Ingeniero Superior de Telecomunicación, Máster en Bioingeniería y Telemedicina y Diplomado en Estadística Aplicada en Ciencias de la Salud, ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada **“CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LA FIBRILACIÓN Y LA INSUFICIENCIA CARDIACA MEDIANTE ANÁLISIS EN ESPACIO, TIEMPO Y FRECUENCIA DE POTENCIALES CARDIACOS ELÉCTRICOS Y ÓPTICOS”** y que dicho trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificación en Madrid, a 15 de Septiembre de 2015

Fdo. Dr. Moreno Planas

DNI: 7552506-L

Fdo. Dr. Pérez-Villacastín

DNI: 15930985-N

Fdo. Dr. Macaya Miguel

DNI: 41093737-M

*A mis abuelos Ángel, Anastasia y Ani,  
grandes ejemplos de integridad, de nobleza  
y de cómo enfrentarse a las adversidades*



## **Agradecimientos**

*A mis directores, especialmente a Javier y Julián, porque además de mis mentores, les considero mis amigos.*

*A Machús, por ser como es, por confiar incondicionalmente en mí, y por tener siempre palabras de ánimo para todos.*

*A mis compis de experimentos, por su gran ayuda y por su amistad: Elena, Cruz, Pablo, Rober y Carol. Y en especial, a Tamara, que viniendo de tan lejos para formarse como electrofisióloga, todavía encontraba tiempo para bajar a experimental a ayudarnos con los cerditos.*

*A David, por su gran ayuda y por confiar en mí para ayudarme en su aventura en el CNIC.*

*A JL, porque nos ha echado una mano siempre que ha hecho falta a lo largo de estos años.*

*A mis compis, presentes y pasados, de la unidad de Experimental del Clínico: Irene, Carmen, Juan, Marcos, Fernando, José Ignacio, Esther, Raquel, Luis, Elena, Sara, Ana, José, Pilar, Ascen, Maite, Joserra, Maribel, Pedro, Loli etc. por conseguir que me haya encontrado tan a gusto en un sótano sin ventanas. En especial a Adela, de la que nos acordamos muy a menudo porque dejó un recuerdo imborrable.*

*A mis compañeros en el CNIC, Manu, Josema, Dani y especialmente a Pepe, por sus sugerencias para mejorar algunos de los trabajos presentados en esta Tesis y por crear un ambiente de trabajo tan agradable e intelectualmente enriquecedor.*

*A mis amigos, por acompañarme y alegrarme la vida. En especial a Charlie y María y a mi círculo de compis de la academia: Nacho, Duque, Neli, Jorge, Rebe, Juan, Almu, Poto, Rosa, Mar, Alberto, etc.*

*A todos aquellos que me han enseñado, o de los que he aprendido algo, a nivel personal o intelectual: a todos mis profesores, a mis compañeros de la Unidad de Arritmias, a los revisores anónimos que con sus críticas y sugerencias han ayudado a mejorar y enriquecer los trabajos presentados en esta Tesis...*

*Y finalmente, quizá a los más importantes en este proceso de aprendizaje, mi familia: a mis hermanas mayores Beatriz y Ana, y sobre todo, a mis padres Ángel y Ascen, por su esfuerzo, dedicación y comprensión, que jamás podré agradecer adecuadamente.*

<b>0. Resumen / Summary.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>15</b>
1.1 Estructura de la Tesis.....	17
1.2 Esquema y funcionamiento de un sistema de CO.....	18
1.2.1 Descripción global de un sistema de CO.....	18
1.2.2 Sistema de perfusión Langendorff.....	23
1.2.3 Emisión de fluorescencia sensible al potencial de acción transmembrana.....	24
1.2.4 Fuentes de luz.....	28
1.2.5 Filtros ópticos.....	29
1.2.6 Lentes.....	30
1.2.7 Fotodetectores.....	35
1.3 Acondicionamiento de las señales obtenidas mediante CO.....	39
1.3.1 Filtrado espacio-temporal.....	39
1.3.2 Enmascarado.....	47
1.4 Técnicas de análisis asociadas al CO que se han trasladado a la clínica.....	48
1.4.1 Mapas de activación, repolarización, refractariedad y longitud de onda.....	48
1.4.2 Análisis espectral y frecuencias dominantes.....	48
1.4.3 Cartografiado de fases.....	51
1.5 Variantes y tendencias en CO.....	52
1.5.1 Sistemas ratiométricos duales para medida del potencial transmembrana.....	51
1.5.2 CO de los transitorios de calcio intracelular.....	52
1.5.3 CO simultáneo de tensión transmembrana y transitorios de calcio con dos sensores.....	53
1.5.4 CO simultáneo de tensión transmembrana y transitorios de calcio con un sólo sensor.....	54
1.5.5 Transiluminación .....	56

1.5.6	<i>Sistemas para la medida de potenciales de acción ópticos intramurales.....</i>	<i>57</i>
1.5.7	<i>Reconstrucción de la superficie epicárdica del corazón y CO panorámico de corazones grandes .....</i>	<i>58</i>
1.5.8	<i>CO endocárdico y epicárdico simultáneo en modelos experimentales de FA.....</i>	<i>60</i>
<b>2.</b>	<b>Antecedentes, Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>63</b>
2.1	Antecedentes, hipótesis y objetivos del Capítulo 3.....	65
2.2	Antecedentes, hipótesis y objetivos del Capítulo 4.....	66
2.3	Antecedentes y objetivos del Capítulo 5.....	67
<b>3.</b>	<b>Increased intraventricular pressures are as harmful as the electrophysiological substrate of heart failure in favoring sustained reentry in the swine heart (<i>Heart Rhythm</i> 2015; 12:2172-2183).....</b>	<b>69</b>
3.1	Abstract.....	71
3.2	Introduction.....	71
3.3	Methods.....	72
3.3.1	<i>HF-ER Model.....</i>	<i>72</i>
3.3.2	<i>Isolated heart preparation and experimental protocol.....</i>	<i>72</i>
3.3.3	<i>Optical data processing and analysis.....</i>	<i>72</i>
3.3.4	<i>Arrhythmia inducibility.....</i>	<i>74</i>
3.3.5	<i>Statistical analysis.....</i>	<i>74</i>
3.4	Results.....	74
3.4.1	<i>HF-ER induction, echocardiographic findings and ECG data.....</i>	<i>74</i>
3.4.2	<i>Optical mapping measurements.....</i>	<i>74</i>
3.4.3	<i>Detailed analysis of the induced arrhythmias.....</i>	<i>76</i>
3.5	Discussion.....	76
3.5.1	<i>Main findings.....</i>	<i>76</i>
3.5.2	<i>HF electrophysiological remodeling.....</i>	<i>77</i>
3.5.3	<i>Increased IVP.....</i>	<i>78</i>
3.5.4	<i>AA milieu.....</i>	<i>79</i>
3.5.5	<i>Why was blebbistatin not used?.....</i>	<i>80</i>

3.5.6	<i>Study limitations</i> .....	80
3.6	Conclusion.....	81
3.7	References.....	81
3.8	Clinical perspectives.....	82
3.9	Online supplementary material.....	83
3.9.1	<i>Expanded methods</i> .....	83
3.9.2	<i>Supplementary results (discussed)</i> .....	92
3.9.3	<i>Supplementary references</i> .....	102
 4.	<b>K<sub>ATP</sub> channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation (<i>Cardiovasc Res</i> 2013; 99:576-585)</b> .....	<b>107</b>
4.1	Abstract.....	109
4.2	Introduction.....	109
4.3	Methods.....	110
4.3.1	<i>Isolated heart preparation and optical recordings</i> .....	110
4.3.2	<i>Spectral analysis, phase singularities, and rotor tracking</i> .....	110
4.3.3	<i>Pseudo-bipolar electrograms</i> .....	110
4.3.4	<i>Statistical analysis</i> .....	110
4.4	Results.....	110
4.4.1	<i>Spectral analysis</i> .....	110
4.4.2	<i>Rotor density, stability, and core size</i> .....	110
4.4.3	<i>Persistent and leading rotors: correlation with activation and organization</i> .....	111
4.4.4	<i>Quasi-periodic drifting rotors on inter-domain boundaries: beat phenomenon</i> .....	112
4.4.5	<i>Rotors and pseudo-bipolar recordings</i> .....	113
4.5	Discussion.....	114
4.5.1	<i>Cromakalim and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels</i> .....	114
4.5.2	<i>Accelerated VF and signal organization</i> .....	114
4.5.3	<i>Rotor dynamics and K<sup>+</sup> currents</i> .....	115
4.5.4	<i>Stationary persistent and leading rotors</i> .....	116

4.5.5	<i>Beat phenomenon by quasi-periodical drifting rotors.....</i>	116
4.5.6	<i>Complex fractionation and rotors.....</i>	117
4.5.7	<i>Limitations.....</i>	117
4.6	References.....	118
4.7	Online supplementary material.....	119
4.7.1	<i>Expanded methods.....</i>	119
4.7.2	<i>Supplementary results.....</i>	125
4.7.3	<i>Supplementary references.....</i>	128
<b>5.</b>	<b>Mechanistic approaches to detect, target and ablate the drivers of atrial fibrillation (<i>Circ Arrhythm Electrophysiol</i> 2016 Jan).....</b>	<b>133</b>
5.1	Introduction.....	135
5.2	Mechanisms Underlying AF Maintenance.....	135
5.2.1	<i>Historical Perspective: Reentry, Ectopic Foci, Random Wavelets, CFAEs and Endo-Epicardial Breakthroughs.....</i>	135
5.2.2	<i>Rotors and Scroll Waves.....</i>	136
5.3	Mapping Methods to Localize Sources and Understand AF Dynamics.....	136
5.3.1	<i>Spectral analysis and Phase Mapping.....</i>	136
5.3.2	<i>Simultaneous Epicardial and Endocardial Optical Mapping.....</i>	136
5.3.3	<i>Multielectrode Plaque Epicardial Electrical Mapping.....</i>	138
5.3.4	<i>Basket-Catheter Endocardial Electrical Mapping.....</i>	139
5.3.5	<i>Body Surface Mapping (BSM).....</i>	140
5.3.6	<i>Electrocardiographic Imaging (ECGI).....</i>	141
5.4	Outcomes of New Mapping and Mechanistic Approaches for AF Ablation.....	142
5.4.1	<i>Ablation of High Dominant Frequency Sites.....</i>	142
5.4.2	<i>Focal Impulse and Rotor Modulation (FIRM) Ablation.....</i>	142
5.4.3	<i>Ablation of Driver Domains in Persistent AF.....</i>	142
5.5	Controversies and Future Directions.....	142
5.6	Concluding Remarks.....	143
5.7	References.....	143

<b>6. Discusión.....</b>	<b>147</b>
6.1 Acerca del cartografiado óptico .....	149
6.1.1 <i>Microelectrodos vs cartografiado óptico .....</i>	150
6.1.2 <i>Cartografiado óptico vs cartografiado eléctrico.....</i>	151
6.1.3 <i>Requisitos de resolución temporal y espacial y elección del detector apropiado.....</i>	153
6.1.4 <i>Mejorando la SNR: Filtrado vs Promediado.....</i>	155
6.1.5 <i>Limitaciones del cartografiado óptico.....</i>	156
6.2 Actualización de la discusión acerca de los mecanismos de la FV .....	160
6.2.1 <i>Papel de las corrientes rectificadoras de potasio en la FV.....</i>	160
6.2.2 <i>Canales de potasio sensibles al ATP (<math>K_{ATP}</math>). Efecto anti-fibrilatorio del bloqueo de los canales <math>K_{ATP}</math> .....</i>	160
6.2.3 <i>Hay algún bloqueador efectivo y específico de los canales <math>K_{ATP}</math> del sarcolema?.....</i>	162
6.2.4 <i>Papel del sistema de Purkinje vs. gradientes de <math>I_{KATP}</math> en la FV de larga duración durante isquemia global. Interacción de la apertura de los canales <math>K_{ATP}</math>, hiperpotasemia y bajo pH.....</i>	163
6.2.5 <i>Papel del <math>Ca^{2+}</math> en el mantenimiento de la FV.....</i>	165
6.2.6 <i>Fases de la FV en presencia de isquemia global. Estudios en corazón humano.....</i>	167
6.2.7 <i>¿Rotores dirigiendo la FV en paciente?.....</i>	167
6.3 Suplemento a la discusión acerca de las nuevas técnicas de bases mecanicistas para la ablación de la FA.....	168
6.3.1 <i>Controversia reciente sobre el sistema FIRM para cartografiado y ablación de la FA.....</i>	168
6.3.2 <i>Mecanismos propuestos para mantener la FA persistente y de larga duración. ¿Son los rotores causa o consecuencia de la fibrilación?.....</i>	172
6.3.3 <i>Acerca del uso del análisis espectral para detectar las fuentes de alta frecuencia.....</i>	180
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>183</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>189</b>

<b>Apéndice A. Editoriales asociados a los artículos originales presentados.....</b>	<b>215</b>
A.1 What can mechanics teach electricians about arrhythmias in heart failure? ( <i>Heart Rhythm</i> 2015; 12:2184-2185).....	217
A.2 And the beat goes on...the beat goes on: organization and quasi-periodicity in ventricular fibrillation ( <i>Cardiovasc Res</i> 2013;99:375-377).....	221
<b>Apéndice B. Otras aportaciones con contribución relevante del doctorando.....</b>	<b>225</b>
B.1 Morphological and Thermodynamic Comparison of the Lesions Created by 4 Open-Irrigated Catheters in 2 Experimental Models ( <i>J Cardiovasc Electrophysiol.</i> 2014;25:1391-1399).....	227
B.2 Letter to the Editor ( <i>J Cardiovasc Electrophysiol.</i> 2015; 26:E6).....	236
B.3 Response to Letter to the Editor ( <i>J Cardiovasc Electrophysiol.</i> 2015; 26:E7-8)....	237
B.4 Skeletal myoblast implants induce minor propagation delays, but do not promote arrhythmias in the normal swine heart ( <i>Europace</i> 2010;12:1637-1644).....	241
B.5 Editorial: Cell-based therapy of the failing heart: a need to connect for proper electrical and contractile function ( <i>Europace</i> 2010;12:1520-1521).....	249
B.6 Predictors of Luminal Loss in Pulmonary Veins After Radiofrequency Ablation ( <i>Rev Esp Cardiol.</i> 2015 Epub ahead of print).....	253
<b>Apéndice C. Proyectos Fin de Master dirigidos por el doctorando.....</b>	<b>261</b>
C.1 Sistema de cartografiado óptico en corazones grandes perfundidos con sangre: registro simultáneo de potenciales transmembrana y transitorios de calcio mediante un único fotodetector CCD.....	263



# **Resumen** ***Summary***





## Summary

### ***Electrophysiological characterization of cardiac fibrillation and heart failure through analysis in space, time and frequency of electrical and optical cardiac potentials***

#### **Introduction**

This Doctoral Thesis largely consists of 3 published articles in which the technique known as “optical mapping” has an essential role. The introduction of optical mapping over two decades ago enabled the characterization of cardiac wave propagation with high spatial (sub-millimeter) and temporal (1-3 ms) resolution. Upon quasi-monochromatic illumination of the mapped surface (with light of an specific wavelength), a previously injected voltage-sensitive dye emits fluorescence that is projected onto a video camera with high acquisition rate. As an example of the insights provided by this technique, the use of optical mapping postulated rotors (functional re-entries generating spiral wavefronts) as potential drivers of cardiac fibrillation in animal models. Generation of phase movies identified several patterns of activation during cardiac fibrillation, including the aforementioned rotors, but also breakthroughs/foci, spatiotemporally organized periodic waves and disorganized activity/wavebreaks. In addition, spectral analysis of the registered optical action potentials enabled the identification of high-frequency areas potentially driving the fibrillation process, even in the absence of visible epicardial rotors. More recently, simultaneous mapping of the endocardial and epicardial surfaces of the atria enabled interpretation of the 3D behavior of scroll waves, whose 2D endo and/or epicardial manifestations are usually rotors or breakthroughs.

Therefore, optical mapping can be considered as a powerful tool to register activation/repolarization patterns during cardiac arrhythmias with high spatiotemporal resolution. However, like any approach, current optical mapping strategies have some limitations: i) they require the use of toxic voltage-sensitive dyes that preclude their use in *in-vivo* human studies; ii) the isolated heart model used in optical mapping studies does not include the effect of the autonomic nervous system which may have a significant impact on certain cardiac arrhythmias, and iii) the current optical mapping technology does not allow “panoramic” simultaneous endo-epicardial or true intramural mapping.

In this Thesis, we used optical mapping to characterize, at the tissue level, the spatio-temporal patterns of activation and repolarization that precede or are present during cardiac arrhythmias. Specifically, we used optical mapping in:

- i) A porcine model of heart failure (HF, **Chapter 3**) in order to evaluate the individual and combined contributions of several potentially proarrhythmic factors usually present in HF patients;
- ii) A porcine model of ventricular fibrillation (VF, **Chapter 4**) in order to demonstrate the feasibility, under certain conditions, of a VF driven by a limited number of sources in a heart whose size is similar to the human one.

In **Chapter 5**, we present a review of the most recent mapping and ablation approaches in atrial fibrillation (AF). In a way, these novel approaches (Narayan et al. JACC 2012, Atienza et al. JACC 2014, Haïssaguerre et al. Circulation 2014) are the heirs of optical mapping since they are based on the concept that AF can be driven by a limited number of sources (rotors or foci) or domains with a high density of potential drivers, and they often use algorithms that were originally developed for optical mapping such as spectral analysis or phase mapping.

## Background, Hypotheses and Objectives

Regarding HF (**Chapter 3**), electrophysiological remodeling (HF-ER) often includes the effect of chronically elevated intraventricular pressures (IVP) and promotes ventricular tachycardia/fibrillation (VT/VF). In addition, acutely-increased IVPs have been associated with a higher rate of VT/VF episodes in Chronic HF (CHF). In our porcine model of HF, we hypothesized that increased IVPs and/or an ionic-imbalanced (acidified), catecholamine-rich (adrenergic) milieu (AA-milieu) may contribute as much as HF-ER to the substrate for reentry in HF. We used a porcine model of tachycardiomyopathy and evaluated the individual/combined contributions of 1) increased IVPs, 2) HF-ER and 3) AA-milieu.

As regards VF (**Chapter 4**), its underlying mechanisms are still disputed. Experimental models have demonstrated either spiral waves generated by periodic high-frequency sources (rotors), multiple wavelets, or focal sources as possible mechanisms underlying VF dynamics. Previous studies in large animal hearts either failed to identify reentry/spiral waves on the epicardium, or recorded only very short-lived reentrant activity. In the human heart, short-lived epicardial and intramural spiral fronts and random propagation have been found to coexist. In addition, recent studies have highlighted the role of  $K_{ATP}$ -channels in VF. In our porcine model of VF, we hypothesized that, under certain conditions, VF can be driven by stable and epicardially detectable rotors in large hearts. To test our hypothesis, we used a swine model of accelerated VF by opening  $K_{ATP}$ -channels with cromakalim.

With regard to AF (**Chapter 5**), current guidelines recommend pulmonary vein isolation across the whole spectrum of patients. Yet, the long-term outcomes remain suboptimal, particularly in patients with persistent/long-lasting AF. Nevertheless, the field of AF ablation is

moving away from anatomically based strategies, thanks to the recent introduction of novel approaches designed to track, target and ablate highly localized electrical sources capable of maintaining AF. Such mechanistically based ablation techniques are offering very promising results, and are a direct result of insights into the dynamic behavior of AF obtained from experimental optical mapping studies and computer simulations. Studies are now being conducted in patients via multi-electrode systems (basket-catheter mapping, body-surface mapping and electrocardiographic imaging) that often use algorithms originally developed for optical mapping. The purpose of **Chapter 5** is to briefly review the following:

1. The competing theories that have tried to explain the mechanisms underlying AF maintenance: reentry, ectopic foci, random wavelets, complex fractionated atrial electrograms (CFAEs), endo-epicardial breakthroughs and rotors/scroll waves.
2. The different methodologies available to date to map electrical activity during AF: spectral analysis, phase mapping, endo-epicardial optical mapping, multielectrode plaque epicardial electrical mapping, basket-catheter endocardial electrical mapping, body surface mapping (BSM) and electrocardiographic imaging (ECGI).
3. The most recent mechanistic ablation approaches aimed at targeting AF drivers and their outcomes: ablation of high dominant frequency sites (Atienza et al. JACC 2014), focal impulse and rotor modulation (FIRM) ablation approach (Narayan et al. JACC 2012) and ablation of driver domains (Haïssaguerre et al. Circulation 2014).
4. The controversies and near-future directions in the search for a comprehensive understanding of AF mechanisms and improving ablation therapy to the benefit of the patient.

## Methods and Results

In **Chapter 3**, HF-ER was induced in 7 pigs by rapid-pacing for ~4 weeks. Seven pigs were used as controls. Hearts were isolated and Langendorff-perfused. Programmed ventricular stimulation was conducted under low/increased-IVP and normal/AA-milieu (4 combinations). Epicardial optical mapping was used to quantify conduction velocities (CV), action potential duration (APD) and dispersion of repolarization (DoR). HF-ER decreased CV (-34%,  $p=0.002$ ), and increased APD (+11%,  $p=0.024$ ) and DoR (+21%,  $p=0.007$ ). Increased IVP augmented DoR (+36%,  $p<0.001$ ), and decreased CV (-17%,  $p=0.001$ ) and APD (-8%,  $p<0.001$ ). The AA-milieu consistently modified only APD (-9%,  $p<0.001$ ) and led to amplified inter/intra-subject heterogeneity. Increased IVP similarly raised the odds of inducing sustained VT/VF as the presence of HF-ER (>6-fold).

In **Chapter 4**, optical mapping, spectral analysis and phase singularity tracking were performed in 8 perfused swine hearts during VF. Pseudo-bipolar electrograms were computed.  $K_{ATP}$ -channel opening almost doubled the maximum dominant frequency ( $14.3 \pm 2.2$  vs.  $26.5 \pm 2.8$  Hz,  $p < 0.001$ ) and increased the maximum regularity index ( $0.82 \pm 0.05$  vs.  $0.94 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ ), the density of rotors ( $2.0 \pm 1.4$  vs.  $16.0 \pm 7.0$  rotors/cm<sup>2</sup>s,  $p < 0.001$ ) and their maximum lifespans (medians: 368 vs.  $\geq 3410$  ms,  $p < 0.001$ ). Persistent rotors ( $\geq 1$  movie = 3410 ms, some of them performing thousands of rotations) were found in all hearts after cromakalim (mostly coinciding with the fastest and highest organized areas), but they were not epicardially visible at baseline VF. A “beat phenomenon” ruled by inter-domain frequency gradients was observed in all hearts after cromakalim. Acceleration of VF did not reveal any significant regional preponderance. Complex fractionated electrograms were not found in areas near persistent rotors.

## Conclusions

In our porcine model of HF (**Chapter 3**), by magnifying DoR, decreasing CV and shortening APD, increased IVP was as harmful as HF-ER in favoring the substrate for sustained re-entry. Indeed, both factors similarly increased the odds of inducing sustained ventricular arrhythmias (>6-fold) in our experimental model. The AA-milieu contributed to a much lesser extent. Thus, a stricter control of IVP might be postulated as a useful add-on antiarrhythmic strategy in HF.

In our porcine model of VF (**Chapter 4**), we found that, upon  $K_{ATP}$ -channel opening, VF consisted of rapid and highly organized domains mainly due to stationary rotors, surrounded by poorly organized areas. A periodic amplitude modulation displayed as a “beat-phenomenon” due to the quasi-periodic onset of drifting rotors was observed. These findings demonstrate the feasibility of a VF driven by stable rotors in hearts whose size is similar to the human heart. Our model also showed that complex fractionation does not seem to localize stationary rotors.

In our review about mechanistic approaches to detect, target and ablate the drivers of AF (**Chapter 5**), we offer several concluding remarks. For example, multiple experimental and clinical studies using widely different technologies are creating a growing body of evidence in favor of organized sources underlying AF maintenance. It remains unresolved whether such sources are: i) one or a few stationary and stable rotors or micro-anatomic intramural reentries, ii) multiple short-lived but iteratively created rotors at restricted locations, iii) stable ectopic foci, or iv) short-lived but repetitively triggered focal bursts. Interestingly, some of these seemingly different underlying mechanisms might converge if one considers the different mapping, filtering and interpolation approaches that are being used to display the atrial electrical data, the 3D nature of the atrial tissue, and the imperfections of the recording systems being used. Recent studies using differing novel mapping approaches specifically targeting these potential AF

sources have been reported with very promising results. Such mechanistically based ablation techniques evolved thanks to insights into the dynamic patterns of AF provided by optical mapping studies and computer-based simulations of AF dynamics, which yielded algorithms that are now being used in point-by-point sequential mapping, basket-catheter mapping, body surface mapping and electrocardiographic imaging.

**Keywords:** Optical mapping, spectral analysis, phase mapping, arrhythmia (mechanisms), reentry, heart failure, remodeling, stretch, ventricular fibrillation, rotors,  $K_{ATP}$ , atrial fibrillation, ablation, electrical mapping, body surface mapping, electrocardiographic imaging.



## Resumen

### ***Caracterización electrofisiológica de la fibrilación y la insuficiencia cardíaca mediante análisis en espacio, tiempo y frecuencia de potenciales cardíacos eléctricos y ópticos***

#### **Introducción**

Esta Tesis Doctoral está constituida en su mayor parte por 3 artículos publicados en los que la técnica conocida como "cartografiado óptico" tiene un papel esencial. La introducción del cartografiado óptico hace más de dos décadas permitió la caracterización de la propagación de las ondas eléctricas en el corazón con alta resolución espacial (submilimétrica) y temporal (1-3 ms). Una vez se ilumina la región a estudiar con luz cuasi-monocromática (luz de una determinada longitud de onda), una molécula sensible al voltaje previamente inyectada emite fluorescencia que se proyecta sobre una cámara de vídeo especial que es capaz de adquirir imágenes a alta velocidad. A modo de ejemplo de los hallazgos que ha facilitado el cartografiado óptico, su uso postuló a los rotores (reentradas funcionales que generan frentes de onda espirales) como potenciales "directores" de la fibrilación cardíaca en modelos animales. La generación de películas de fase identificó varios patrones de activación durante la fibrilación cardíaca, incluyendo los anteriormente citados rotores, afloramientos/focos, ondas periódicas con alta organización espacio-temporal y actividad desorganizada/rotura de frentes. El análisis espectral de los potenciales de acción ópticos registrados permitió la identificación de áreas de alta frecuencia con potencial para dirigir el proceso de fibrilación incluso en la ausencia de rotores visibles epicárdicamente. Más recientemente, la cartografía simultánea de las superficies endocárdicas y epicárdicas de las aurículas permitió la interpretación del comportamiento de las "ondas pergamino" 3D, cuya manifestación 2D endo o/y epicárdica es usualmente un rotor o un afloramiento.

Por lo tanto, el cartografiado óptico puede ser considerado como una herramienta de gran relevancia para registrar los patrones de activación/repolarización durante las arritmias cardíacas, con alta resolución espacial y temporal. Sin embargo, como cualquier técnica, las estrategias actuales de mapeo óptico tienen algunas limitaciones: i) se requiere el uso de moléculas sensibles al voltaje tóxicas que impiden su uso en estudios humanos *in vivo*; ii) el modelo de corazón aislado utilizado en estudios de cartografiado óptico no incluye el efecto del sistema nervioso autónomo que puede tener un impacto significativo en ciertas arritmias cardíacas, y iii) la tecnología de cartografiado óptico actual no permite registros "panorámicos" endo-epicárdicos simultáneos o verdadero cartografiado intramural.

En esta tesis, se utilizó la cartografía óptica para caracterizar, a nivel tisular, los patrones espacio-temporales de la activación y la repolarización que preceden o están presentes durante



las arritmias cardíacas. En concreto, se utilizó la cartografía óptica en: i) un modelo porcino de insuficiencia cardíaca (IC, **Capítulo 3**) con el fin de evaluar las contribuciones individuales y combinadas de varios factores potencialmente proarrítmicos normalmente presentes en los pacientes con IC; y ii) en un modelo porcino de fibrilación ventricular (FV, **Capítulo 4**) con el fin de demostrar la viabilidad, bajo ciertas condiciones, de una FV mantenida por un número limitado de fuentes en corazones de tamaño similar al humano. En el **Capítulo 5**, se presenta una revisión de los enfoques de cartografía y ablación más recientes en la fibrilación auricular (FA). En cierto modo, estos nuevos enfoques (Narayan et al. JACC 2012, Atienza et al. JACC 2014, Haïssaguerre et al. Circulation 2014) son herederos del cartografiado óptico, ya que se basan en el concepto de que la FA puede ser mantenida por un número limitado de fuentes (rotores o focos) o dominios con una alta densidad de potenciales fuentes. Además, estos nuevos enfoques a menudo utilizan algoritmos que fueron desarrollados originalmente para el cartografiado óptico, como son el análisis espectral o el cartografiado de fases.

### **Antecedentes, hipótesis y objetivos**

Con respecto a la IC (**Capítulo 3**), el remodelado electrofisiológico asociado (RE-IC) a menudo incluye el efecto de presiones intraventriculares elevadas de manera crónica y favorece la aparición de taquicardia/fibrilación ventricular (TV/FV). Además, el aumento agudo de la presión intraventricular se ha asociado con una mayor tasa de episodios de TV/FV en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (ICC). En nuestro modelo porcino de IC, nuestra hipótesis es que el aumento agudo de la presión intraventricular o/y un medio extracelular desequilibrado iónicamente (acidificado), y rico en catecolaminas (adrenérgico) pueden contribuir tanto como el remodelado electrofisiológico al sustrato para la reentrada en la IC. Para comprobar esta hipótesis, utilizamos un modelo porcino de taquicardiomiopatía y evaluamos las contribuciones individuales y combinadas de 1) los aumentos agudos de presión intraventricular, 2) el remodelado electrofisiológico de la IC y 3) la presencia de un medio acidificado y adrenérgico.

En cuanto a la FV (**Capítulo 4**), todavía existe gran controversia sobre sus mecanismos subyacentes. Los modelos experimentales han mostrado varios mecanismos potenciales que parecen subyacer a la dinámica de la FV: ondas espirales generadas por fuentes periódicas de alta frecuencia (rotores), múltiples ondas pequeñas (*wavelets*), o fuentes focales. Estudios previos en animales con corazones grandes, o bien no lograron identificar rotores/ondas espirales en el epicardio, o bien registraron únicamente actividad reentrante de muy corta duración. En el corazón humano parecen coexistir frentes espirales epicárdicos e intramurales de corta duración, junto con propagación aleatoria. Además, estudios recientes han puesto de relieve el papel de los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) en la FV. En nuestro modelo porcino de FV, nuestra hipótesis es que la FV puede ser dirigida por rotores estables y detectables epicárdicamente en corazones grandes, al menos en determinadas condiciones. Para poner a prueba nuestra

hipótesis, utilizamos un modelo porcino de FV acelerada mediante la apertura de los canales  $K_{ATP}$  con cromakalima.

Con respecto a la FA (**Capítulo 5**), las directrices actuales recomiendan el aislamiento de las venas pulmonares en todo el espectro de pacientes. Sin embargo, los resultados a largo plazo siguen siendo subóptimos, particularmente en pacientes con FA persistente o de larga duración. En cualquier caso, el campo de la ablación de la FA se está alejando de las estrategias puramente basadas en anatomía, gracias a la reciente introducción de nuevos enfoques diseñados para detectar, realizar un seguimiento y ablacionar fuentes eléctricas altamente localizadas capaces potencialmente de mantener la FA. Tales técnicas de ablación mecanicistas están ofreciendo resultados muy prometedores, y se pueden considerar el resultado directo de los conocimientos sobre el comportamiento dinámico de la FA obtenidos a partir de estudios de cartografiado óptico experimentales y simulaciones por ordenador. Actualmente se están realizando estudios electrofisiológicos en los pacientes con sistemas multi-electrodo (mapeo con catéteres *basket*, cartografía de la superficie corporal y de imagen electrocardiográfica) que a menudo se combinan con algoritmos desarrollados originalmente para el cartografiado óptico. El propósito del **Capítulo 5** es revisar brevemente lo siguiente:

1. Las teorías que compiten para tratar de explicar los mecanismos eléctricos subyacentes en el mantenimiento de la FA: reentrada, focos ectópicos, pequeñas ondas (*wavelets*) aleatorias, electrogramas auriculares complejos fraccionados, afloramientos endo-epicárdicos, y, rotores/ondas “pergamino”.
2. Las diferentes metodologías disponibles hasta la fecha para cartografiar la actividad eléctrica durante la FA: análisis espectral, cartografiado de fases, cartografiado óptico endo-epicárdico, placas multielectrodo epicárdicas para cartografiado eléctrico, catéteres *basket* para cartografía eléctrica del endocardio, cartografía de superficie corporal y de imagen electrocardiográfica.
3. Los enfoques mecanicistas de ablación más recientes encaminados a la detección de los “directores” de la FA y sus resultados: ablación de áreas con alta frecuencia dominante (Atienza et al. JACC 2014), el enfoque de la ablación FIRM (Narayan et al. JACC 2012) y la ablación de los dominios “directores” (Haïssaguerre et al. Circulation 2014).
4. Las controversias y tendencias futuras en la búsqueda de una comprensión global de los mecanismos de la FA y la mejora de la terapia de ablación para el beneficio del paciente.

## Métodos y Resultados

En el **Capítulo 3**, se indujo remodelado electrofisiológico de IC en 7 cerdos mediante estimulación rápida durante ~4 semanas. Se utilizaron 7 cerdos como controles. Los corazones se aislaron y se perfundieron mediante sistema Langendorff. Se llevó a cabo estimulación ventricular programada en condiciones de presión intraventricular “baja” o “aumentada” y medio “normal” o “acidificado y adrenérgico” (4 combinaciones). Se utilizó cartografiado óptico epicárdico para cuantificar la velocidad de conducción, la duración del potencial de acción y la dispersión de la repolarización. Globalmente, el remodelado electrofisiológico de la IC disminuyó la velocidad de conducción (-34%,  $p = 0,002$ ), y aumentó la duración del potencial de acción (+11%,  $p = 0,024$ ) y la dispersión de la repolarización (+21%,  $p = 0,007$ ). La presión intraventricular elevada aumentó la dispersión de la repolarización (+36%,  $p < 0,001$ ), y disminuyó la velocidad de conducción (-17%,  $p = 0,001$ ) y la duración del potencial de acción (-8%,  $p < 0,001$ ). El medio acidificado y adrenérgico sólo modificó consistentemente la duración del potencial de acción (-9%,  $p < 0,001$ ) y dio lugar a una gran heterogeneidad tanto inter como intra-sujeto. El aumento de la presión intraventricular elevó las probabilidades de inducir TV/VF de manera similar a la presencia del remodelado electrofisiológico de la IC (> 6 veces).

En el **Capítulo 4**, se realizó cartografía óptica, análisis espectral y seguimiento de las singularidades de fase en 8 corazones de cerdo perfundidos, durante FV. Se calcularon pseudo-electrogramas bipolares. La apertura de los canales  $K_{ATP}$  casi duplicó la frecuencia dominante máxima ( $14,3 \pm 2.2$  vs.  $26,5 \pm 2.8$  Hz,  $p < 0,001$ ) y aumentó el máximo índice de regularidad ( $0,82 \pm 0.05$  vs.  $0,94 \pm 0.04$ ,  $p < 0,001$ ), la densidad de generación de rotores ( $2,0 \pm 1.4$  vs.  $16,0 \pm 7.0$  rotores /cm<sup>2</sup>·s,  $p < 0,001$ ) y su duración máxima (medianas: 368 vs.  $\geq 3410$  ms,  $p < 0,001$ ). Tras el uso de cromakalima, se encontraron rotores persistentes en todos los corazones ( $\geq 1$  película = 3410 ms, algunos de los cuales se mantuvieron visibles epicárdicamente durante miles de rotaciones), en su mayoría coincidentes con las áreas más rápidas y más organizadas. Sin embargo, no se detectaron epicárdicamente rotores persistentes en la FV basal. En todos los corazones se observó un "fenómeno de batido" regido por los gradientes de frecuencia entre dominios después de la aplicación de cromakalima. La aceleración de la FV sin embargo no reveló ninguna preponderancia regional significativa. Finalmente, no se encontraron electrogramas fraccionados complejos en zonas cercanas a los rotores persistentes.

## Conclusiones

En nuestro modelo porcino de IC (**Capítulo 3**), las presiones intraventriculares elevadas fueron tan perjudiciales como el remodelado electrofisiológico de la IC en la generación de un sustrato que favorecía la reentrada sostenida. Esto fue debido a una dispersión de la repolarización aumentada, una velocidad de conducción disminuida y un acortamiento del potencial de acción, como consecuencia de una presión intraventricular elevada. De hecho,

ambos factores incrementaron de manera similar las probabilidades de inducir arritmias ventriculares sostenidas en nuestro modelo experimental (>6 veces). El medio acidificado y adrenérgico contribuyó mucho menos. De acuerdo a estos resultados, un control más estricto de las presiones intraventriculares se podría postular como una estrategia antiarrítmica adicional de utilidad en los pacientes con IC.

En nuestro modelo porcino de FV (**Capítulo 4**), se encontró que, al abrir los canales  $K_{ATP}$ , la FV consistió en dominios rápidos y altamente organizados (principalmente dirigidos por rotores estacionarios), rodeados de zonas de baja organización (rotura de frentes, conducción fibrilatoria). Se observó una modulación de amplitud periódica que se manifestó como un "fenómeno de batido" debido a la aparición casi periódica de rotores no estacionarios. Estos hallazgos demuestran la factibilidad de una FV dirigida por rotores estables en corazones cuyo tamaño es similar al corazón humano. Nuestro modelo también mostró que el fraccionamiento complejo no parece tener correlación espacial con los dominios mantenidos por rotores estacionarios.

En nuestra revisión de los enfoques mecanicistas para detectar, seguir y ablacionar los "directores" de la FA (**Capítulo 5**), ofrecemos varias reflexiones a modo de conclusión. Por ejemplo, que varios estudios experimentales y clínicos utilizando tecnologías muy diferentes están creando una evidencia creciente a favor de una FA mantenida mediante fuentes organizadas. Queda por resolver si esas fuentes son: i) uno o varios rotores estacionarios y estables o reentradas micro-anatómicas intramurales, ii) múltiples rotores de corta duración pero creados de forma repetitiva en localizaciones restringidas, iii) focos ectópicos estables, o iv) a ráfagas focales cortas pero repetitivas. Curiosamente, algunos de estos mecanismos subyacentes, aparentemente diferentes, podrían converger si se consideran los diferentes enfoques de cartografiado, filtrado e interpolación que se utilizan para visualizar los datos eléctricos auriculares, la naturaleza 3D del tejido auricular, y las imperfecciones de los sistemas de registro que se utilizan. Recientemente se han publicado estudios con resultados muy prometedores que utilizan nuevos enfoques de mapeo dirigidos específicamente a detectar y ablacionar las fuentes potenciales de la FA. Tales técnicas de ablación de bases mecanicistas evolucionaron gracias al conocimiento de los patrones dinámicos de la FA que proporcionaron los estudios de cartografiado óptico y las simulaciones por ordenador, los cuales generaron la necesidad de algoritmos que ahora se están utilizando en la cartografía de puntos secuenciales, la cartografía con catéteres *basket*, la cartografía de superficie corporal y la imagen electrocardiográfica.

**Palabras clave:** cartografiado óptico, análisis espectral, cartografiado de fases, mecanismos de las arritmias, re-entrada, insuficiencia cardíaca, remodelado, estiramiento, fibrilación ventricular, rotores,  $K_{ATP}$ , fibrilación auricular, ablación, cartografiado eléctrico, cartografiado de superficie corporal, imagen electrocardiográfica.





# Capítulo 1

## **Introducción**



## 1.1 Estructura de la Tesis

En esta Tesis Doctoral se presenta fundamentalmente el compendio de 3 artículos publicados entre los años 2013 y 2015 en los que el doctorando ha tenido una contribución muy relevante. Dichos artículos se reproducen en los siguientes capítulos de esta Tesis:

- **Capítulo 3: Increased intraventricular pressures are as harmful as the electrophysiological substrate of heart failure in favoring sustained reentry in the swine heart.** *Heart Rhythm* 2015 Oct;12(10):2172-83
- **Capítulo 4:  $K_{ATP}$  channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation.** *Cardiovasc Res* 2013 Aug;99(3):576-585.
- **Capítulo 5: Mechanistic approaches to detect, target and ablate the drivers of atrial fibrillation.** *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2015 (*In Press*). Se publicará en Enero de 2016.

El nexo de unión entre dichos artículos es la técnica denominada cartografiado óptico (CO), ya que en ella se fundamenta la metodología utilizada en los artículos presentados en los **Capítulos 3 y 4** para analizar en detalle sendos modelos de Insuficiencia Cardíaca (IC) y fibrilación ventricular (FV), respectivamente. En el **Capítulo 5** se presenta una revisión acerca de enfoques mecanicistas para la ablación de la fibrilación auricular (FA), que constituye un claro ejemplo de cómo la traslación de los hallazgos y el conocimiento obtenidos con una técnica puramente experimental como es el CO sobre una arritmia extremadamente compleja como es la FA, puede desembocar en herramientas y metodologías aplicables con éxito en el paciente.

Cada uno de los artículos originales presentados lleva una metodología detallada en forma de suplemento en línea. Sin embargo, ciertos aspectos relacionados con el CO se consideran conocidos y por ello no se profundiza en los mismos en los **Capítulos 3, 4 y 5**. Por este motivo, el presente capítulo de introducción se ha dedicado fundamentalmente a proporcionar una descripción de: i) la técnica de CO y los elementos necesarios para poner en marcha este tipo de sistemas; ii) las técnicas de acondicionamiento de las señales obtenidas (filtrado espacio-temporal y enmascarado); iii) algunas metodologías complementarias que suelen utilizarse para analizar los registros obtenidos con el CO (como el análisis espectral o el cartografiado de fases); y iv) las variantes y tendencias más recientes en CO. Es importante tener en cuenta que las técnicas descritas en el tercer punto, y que permiten un cartografiado detallado de los patrones de activación de las arritmias, se han utilizado recientemente para la creación de nuevos sistemas de cartografiado y ablación de la FA en pacientes. Es por esto que dichos sistemas pueden considerarse herederos del CO, ya que utilizan conceptos y herramientas que fueron originalmente desarrolladas para el mismo.



De esta manera, esta introducción pretende proporcionar una base con la que poder entender plenamente lo presentado en los capítulos siguientes, ya que el potencial lector de esta Tesis muy probablemente tendrá conocimientos avanzados de electrofisiología cardíaca pero no necesariamente sobre CO, ya que se trata de una técnica fundamentalmente experimental y, en general, poco conocida.

## 1.2 Esquema y funcionamiento de un sistema de CO

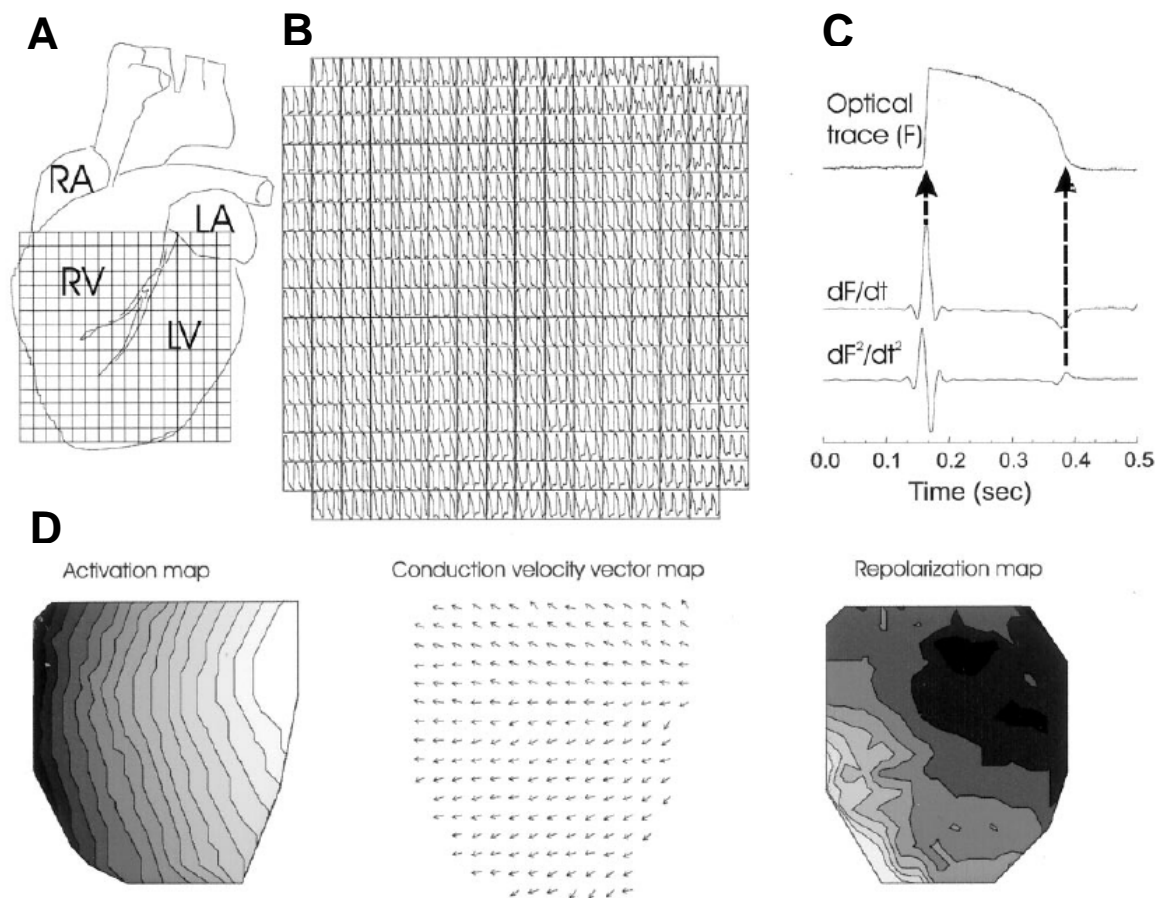
Brevemente, el CO consiste en el registro de la fluorescencia emitida por tintes fotosensibles adheridos a la membrana de las células del corazón, mediante una cámara de alta sensibilidad y alta frecuencia de adquisición de imágenes (típicamente cámaras CCD o CMOS especializadas). Para cada píxel de la imagen (dimensión espacial, **Figura 1A**) se obtiene una señal (dimensión temporal) de fluorescencia (**Figura 1B**) que está relacionada con algún parámetro electrofisiológico de interés, siendo los más típicos los potenciales de acción transmembrana ( $V_m$ ) y los transitorios de calcio intracelular ( $Ca_iT$ ). Como muestra la **Figura 1C**, con las señales anteriores pueden calcularse los instantes de activación (máximo de la derivada primera de la fluorescencia,  $dF/dt$ ) y de repolarización (máximo de la derivada segunda,  $dF^2/dt^2$ ), con los que se generan mapas de activación, de velocidades locales de conducción y de repolarización, entre otros (**Figura 1D**).

En el presente apartado se realiza un análisis de la composición y funcionamiento de un sistema actual de CO. Se comienza con el subapartado 1.2.1, en el que se enumeran los componentes del mismo y se explica muy brevemente su funcionamiento, sin entrar en mucho detalle. Los subapartados posteriores describen con más profundidad cada uno de los componentes necesarios en un sistema de CO: sistema de perfusión Langendorff, tintes sensibles a cambios en el potencial transmembrana, las fuentes de luz, los filtros ópticos de excitación y emisión, las lentes y los detectores. En un apartado posterior, se describirán los procedimientos necesarios de filtrado espacial y temporal para mejorar la relación señal a ruido (*signal to noise ratio*, SNR) de las películas de activación obtenidas, lo que aumenta la fiabilidad de los parámetros medidos en las mismas.

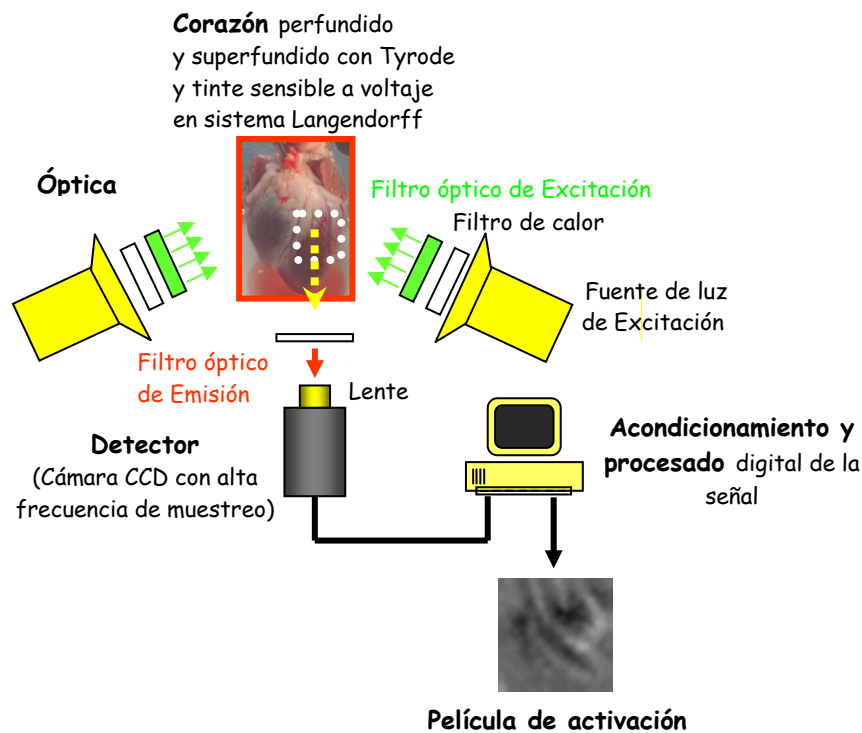
### 1.2.1 Descripción global de un sistema de CO

La **Figura 2** muestra dos esquemas posibles de montajes típicos en un sistema de CO. En ella se muestran los componentes principales de que constan estos sistemas. En primer lugar, el objeto del estudio, que es el corazón. Los corazones bajo estudio están “vivos” y latiendo. Para ello, tras explantar el corazón (**Figura 3A**), éste se conecta a un sistema de perfusión Langendorff (**Figura 3B**). Dicho sistema, que veremos en más detalle en el **subapartado 1.2.2**, y que es muy similar a los sistemas de circulación extracorpórea utilizados en ciertas cirugías cardíacas, se encarga principalmente de hacerle llegar oxígeno y nutrientes al

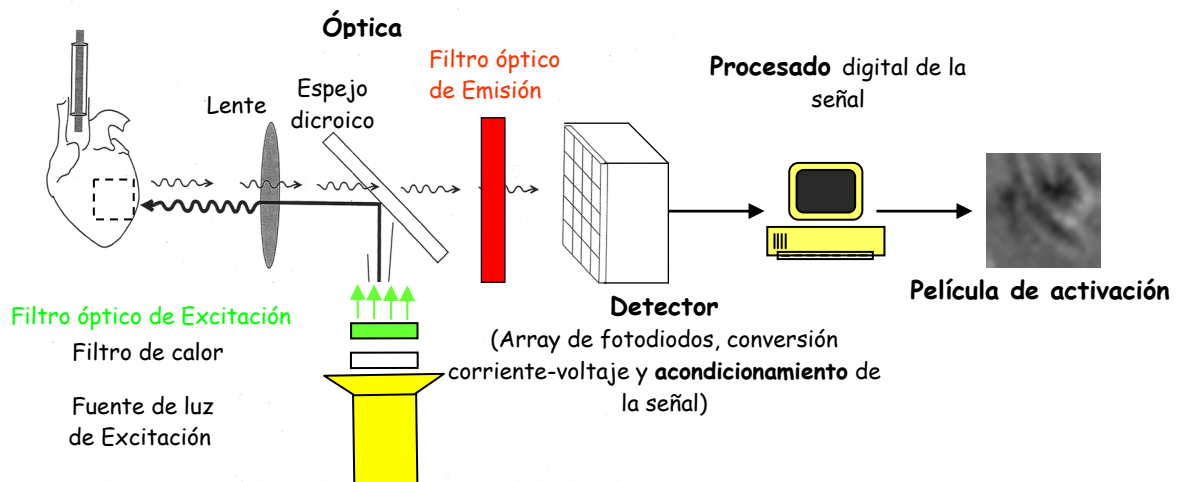
corazón, así como de mantener las concentraciones iónicas que mimeticen el ambiente extracelular de un corazón, habitualmente por medio de una solución nutritiva transparente a 37°C conocida como Tyrode. Una vez perfundido el corazón, se introduce en un recipiente transparente en el que se baña con esa misma solución (superfusión) y se desfibrila. Al cabo de unos minutos, las aurículas habitualmente recuperan el ritmo sinusal, pero si se quiere que los ventrículos estén también en ritmo sinusal, prácticamente siempre es necesario desfibrilarlos. Tras la desfibrilación, el corazón comenzará a latir de manera similar a como lo haría *in vivo*.



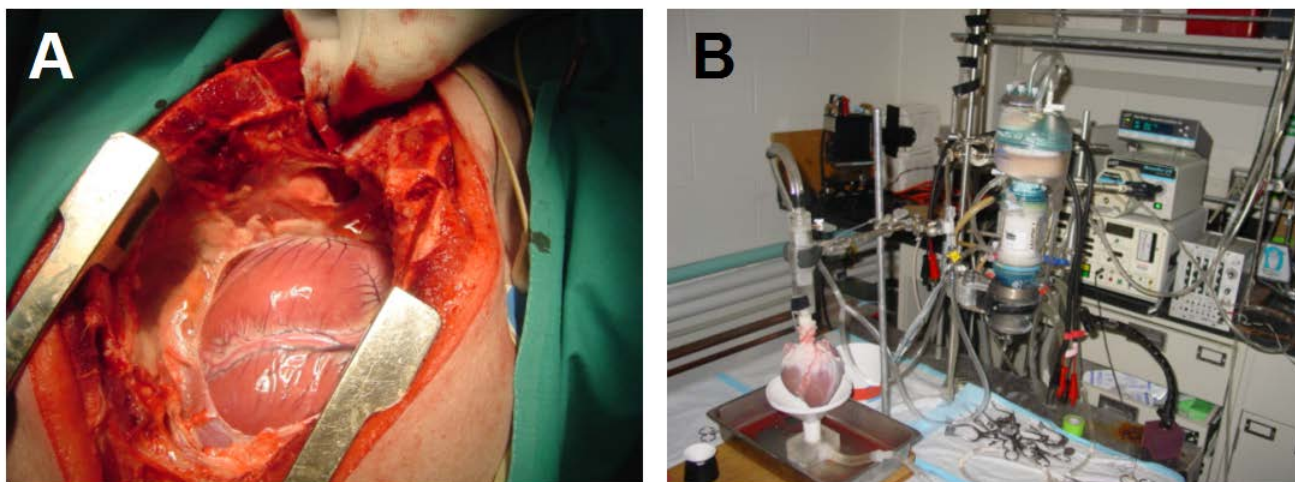
**Figura 1.** A: Esquema de un corazón, sobre el que se superpone una rejilla indicando la zona de tejido que corresponde a cada píxel del detector de CO. B: Esquema del detector, donde en el interior de cada píxel se muestra la evolución temporal de la intensidad de fluorescencia registrada, que corresponde con los potenciales de acción ópticos. C: Procedimiento matemático básico para calcular los instantes de activación (máximo de la derivada primera) y repolarización (máximo de la derivada segunda) de cada potencial de acción óptico. D: Tras calcular los instantes de activación y repolarización de cada píxel, se puede generar un mapa de isócronas de activación (izquierda) y repolarización (derecha). A partir de los instantes de activación, también se puede generar un mapa de velocidades locales de activación (centro). Adaptado de Efimov et al. "Optical imaging of the heart".<sup>1</sup>

**A****B**

**Corazón perfundido y superfundido con Tyrode y tinte sensible a voltaje en sistema Langendorff**



**Figura 2.** Montajes típicos en sistemas de CO. **A:** Montaje con dos fuentes emisoras de luz, cada una de ellas con su filtro de calor, y un filtro de excitación que sólo deja pasar luz del margen de longitudes de onda apropiadas para excitar el tinte sensible al voltaje que hay adherido a las células del corazón. La fluorescencia emitida por el corazón (que lleva información de la evolución temporal de los potenciales de acción de las células cardiacas) es filtrada en el margen de longitudes de onda apropiadas, y llega a un detector que consiste en una cámara CCD (o CMOS) con alta frecuencia de muestreo. **B:** Montaje similar al anterior, pero con una sola fuente emisora de luz, y en el que se utiliza un espejo dicróico para separar la luz de excitación y la de emisión. Esta última llega a un detector, que en este caso consiste en un array de fotodiodos.



**Figura 3. A:** Procedimiento de explante de un corazón animal. **B:** El corazón, una vez explantado y conectado al sistema de perfusión Langendorff, que se encarga de proporcionar oxígeno y nutrientes a las células de corazón y de conseguir la concentración iónica adecuada para simular un ambiente similar al que se encuentra el corazón en su medio habitual mediante el uso de una solución nutritiva (Tyrode).

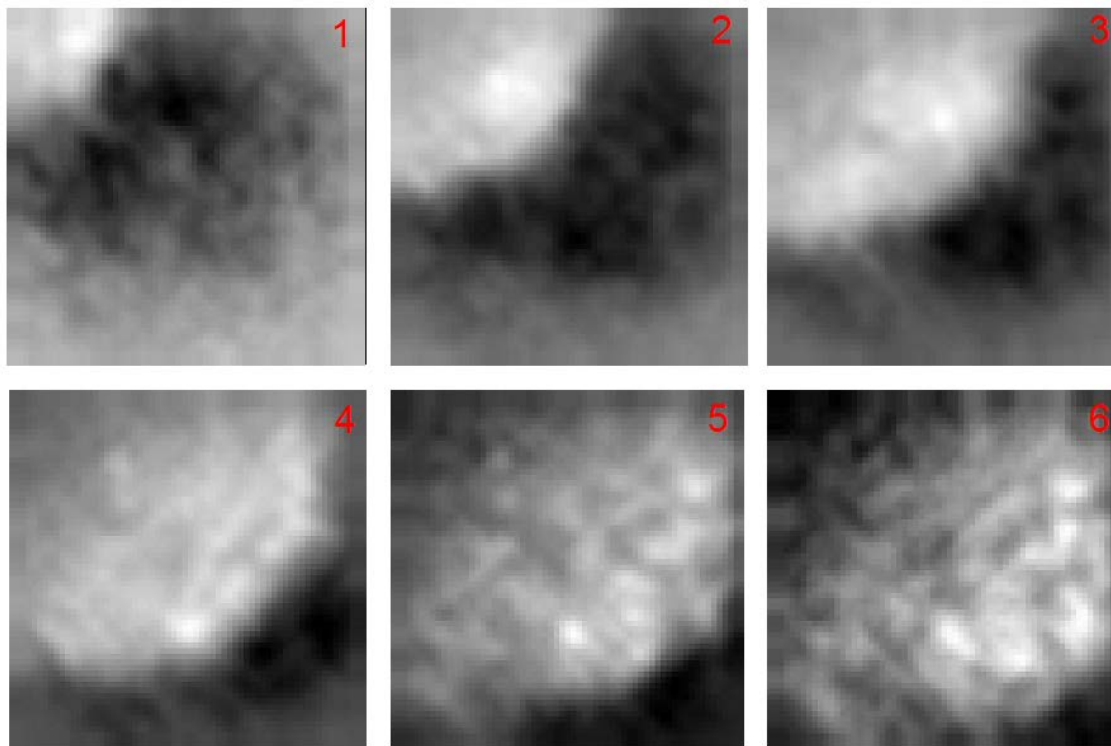
En el CO, se utilizan una o varias fuentes de luz de excitación (el tipo de luz utilizada en nuestro laboratorio se detalla más adelante). Esta luz es filtrada mediante un filtro de calor, para que la preparación cardíaca no vea aumentada su temperatura sustancialmente debido a la luz a la que va a estar expuesta. Posteriormente esa luz es filtrada paso banda mediante un filtro óptico que sólo deja pasar el margen de longitudes de onda apropiadas para excitar las moléculas de tinte que habrá ligadas a las membranas de las células cardíacas.

Dichas moléculas de tinte, al ser iluminadas con una luz de excitación (**subapartado 1.2.4**) apropiadamente filtrada, pasarán de su estado fundamental a su estado excitado, provocando la emisión de fluorescencia en otro margen de longitudes de onda diferentes a la de la luz de excitación. Además el nivel de fluorescencia emitido variará con el potencial de membrana, es decir, los tintes actúan como transductores del potencial de membrana. El proceso por el cual se produce la emisión de fluorescencia que varía siguiendo la evolución temporal del potencial de acción transmembrana, será tratado con mayor profundidad en el **subapartado 1.2.3**.

La luz emitida por el corazón, se hace pasar a través de un filtro óptico (**subapartado 1.2.5**) que dejará pasar el margen de longitudes de onda apropiado, según de que tinte se trate, y será capturada mediante una lente (**subapartado 1.2.6**), que la enfocará sobre el fotodetector (**subapartado 1.2.7**).

Estos fotodetectores permitirán convertir la señal óptica emitida por el corazón, en señales eléctricas, lo que posibilitará fundamentalmente visualizar la propagación del frente de activación eléctrico sobre la superficie del corazón en la zona bajo estudio, lo que en la **Figura 3**

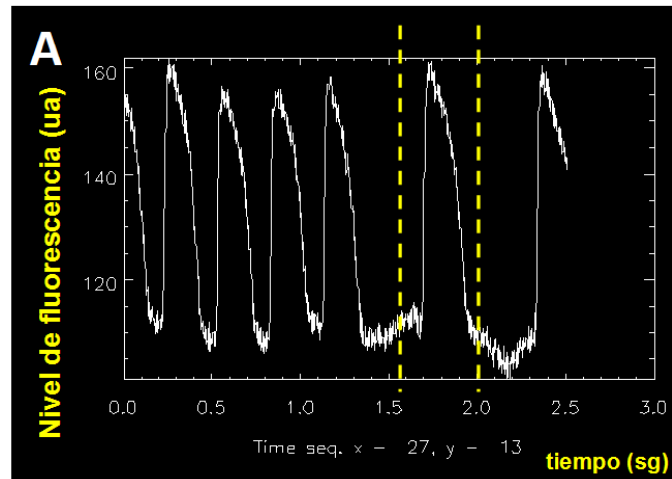
aparece como película de activación. En la **Figura 4** se pueden ver varias imágenes de una película de activación de un frente estimulado, que se desplaza de la esquina superior izquierda de la imagen, a la esquina inferior derecha.



**Figura 4.** Imágenes de una película de CO que muestran capturas en instantes de tiempo secuenciales (1-6) de la propagación de un frente de despolarización que se propaga de la esquina superior izquierda de la imagen a la esquina inferior derecha. Las zonas de alto brillo representan tejido despolarizado.

Además, si se observa la evolución temporal de la intensidad de cada píxel de la imagen, esta se corresponderá con la evolución temporal del potencial transmembrana, en la pequeña zona de tejido que corresponde a dicho píxel en el fotodetector (**Figura 5**).

Tras los filtrados temporales y espaciales apropiados, que veremos en el **apartado 1.3**, la película tendrá la calidad suficiente para extraer de ella toda la información posible, entre la que se **encuentran** los mapas de activación, de repolarización y refractariedad, y de velocidades locales de propagación del frente eléctrico (**Figura 1**), así como la detección de zonas de conducción lenta o incluso de bloqueo, lo cual es el origen de numerosas arritmias por reentrada. El procesamiento necesario para la obtención de estos mapas se expone en detalle en el Capítulo 3. Además, se pueden extraer muchas más informaciones de las películas de CO en función de la aplicación para la que se esté utilizando el CO. Algunas de ellas las trataremos en capítulos posteriores.



**Figura 5.** Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) captada por el fotodetector, en un píxel de coordenadas (27,13). En dicha señal se pueden observar los potenciales de acción ópticos a lo largo de 2,5 segundos de grabación, correspondientes a la pequeña zona de tejido cuya fluorescencia ha sido captada por el elemento del fotodetector correspondiente al píxel (27,13) de la imagen. Uno de los potenciales de acción ópticos registrados aparece encerrado entre líneas amarillas.

### 1.2.2 Sistema de perfusión Langendorff

Como ya se ha dicho, la principal función de un sistema de perfusión Langendorff, es mantener la circulación de una solución nutritiva, denominada Tyrode, que además aporte oxígeno a las células cardíacas, llegando a ellas a través de las arterias coronarias.

La preparación de Langendorff es una técnica experimental de órgano aislado. Su principio básico consiste en perfundir las arterias coronarias a través de una cánula de perfusión retrógrada insertada en la aorta. Cuando se alcanza una presión adecuada del líquido nutriente se cierra la válvula aórtica y se desvía el flujo hacia los orificios de las coronarias, de modo que se perfunde la masa ventricular y el corazón late en vacío, sin existir llenado ventricular.<sup>2, 3</sup> Oscar Langendorff describió la técnica en 1895. Gracias a este tipo de preparación se han logrado importantes avances en la comprensión de la fisiología cardíaca.

En cuanto al líquido de perfusión que circula por el sistema, y con el que se nutre al músculo cardíaco, es posible utilizar Tyrode, sangre, o una mezcla de Tyrode y sangre. Lo más habitual es la utilización de Tyrode, porque al ser transparente permite registrar señales de mayor intensidad mediante CO, por lo que se obtiene una SNR mejor. Una composición habitual para el Tyrode en mmol/L es la siguiente: NaCl, 136,75; MgCl<sub>2</sub>, 1,05; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,41; NaHCO<sub>3</sub>, 11,9; CaCl<sub>2</sub>, 1,8; KCl, 2,68; dextrosa, 5,53; osmolaridad de 315,76 mosm/L. El pH de la solución a 37°C y con oxigenación se mantiene dentro de rangos fisiológicos.

Esta composición puede ser modificada para simular distintos ambientes celulares. Por ejemplo, en experimentos para estudiar las arritmias en un ambiente de insuficiencia cardíaca. En los pacientes que padecen IC, la matriz extracelular se encuentra acidificada por una concentración iónica modificada, además de contener elementos adrenérgicos liberados por el sistema nervioso autónomo. Para “simularla”, hay que modificar coherentemente las concentraciones iónicas en el Tyrode y añadir noradrenalina en la dosis adecuada, como se hizo en algunas configuraciones experimentales del **Capítulo 3**.

### 1.2.3 Emisión de fluorescencia sensible al potencial de acción transmembrana

A lo largo de los años se han desarrollado multitud de “tintes”, utilizados para determinar los patrones espaciales de activación de voltaje en tejidos, células individuales y orgánulos. Estos “tintes” han sido de gran utilidad para los científicos, pues han permitido mapear por ejemplo los patrones de actividad eléctrica en preparaciones neuronales complejas, y gracias a ellos se han realizado numerosos experimentos que no hubieran sido posibles mediante otras técnicas como los microelectrodos o el *patch-clamp*.

Además, la disponibilidad de estas moléculas ha tenido un impacto especialmente importante en el estudio de los patrones de activación eléctrica en el tejido cardíaco. G. Salama fue pionero en el uso de los tintes sensibles a voltaje y concretamente de la molécula Di-4-ANEPPS [1-(3-sulfonatopropyl)-4-[ $\beta$ -[2-(di-n-butylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium betaine] para el estudio de la electrofisiología cardíaca.<sup>4-6</sup> Esta molécula es sin duda la más utilizada para el estudio de patrones de activación complejos en el músculo cardíaco, pues muestra unos cambios de fluorescencia relativos durante el potencial de acción de entre el 8% y el 15%, con baja toxicidad y bajo fotoblanqueamiento, y la amplitud de la señal y su cinética es estable durante 2 a 4 horas sin necesidad de introducir nuevas dosis del tinte.<sup>7</sup>

En general, los tintes sensibles a voltaje son moléculas que se ligan a la membrana de las células cardíacas, con alta afinidad. Estas moléculas llegan a ligarse con las células en un corazón completo, con células o tejidos cardíacos aislados, o a células cardíacas cultivadas. La manera de que las moléculas de tinte lleguen a las células es mediante perfusión o superfusión. Mientras están ligadas a las membranas de las células cardíacas, las moléculas de tinte emiten fluorescencia, que tras el apropiado filtrado óptico, permiten obtener una señal proporcional al potencial de membrana. Por tanto, los tintes sensibles a voltaje funcionan como transductores altamente localizados del potencial de membrana, transformando un cambio en el potencial de membrana en un cambio en la intensidad de fluorescencia. Aquí reside la mayor ventaja del CO: la luz emitida se puede medir de forma no invasiva (viéndolo desde el punto de vista de las células), obviando la necesidad de empalar las células con microelectrodos, de tal forma que se minimiza el riesgo de daño celular, y además permitiendo una resolución espacial mucho mayor sólo limitada por el detector.<sup>7</sup>



El proceso de fluorescencia requiere dos pasos básicos:

1. **Excitación:** las moléculas de tinte ligadas a la membrana deben ser excitadas por luz (es decir: fotones) de una determinada longitud de onda para conseguir que estas pasen a su estado excitado.
2. **Emisión:** cuando la molécula vuelve de su estado excitado a su estado fundamental, emite un fotón de mayor longitud de onda (menor energía) que el fotón inicialmente absorbido.

En este apartado se describirán las propiedades físicas y químicas de este tipo de tintes sensibles a voltaje. Existen diversos mecanismos por los cuales un tinte puede mostrar cambios espectrales como respuesta a cambios en el potencial de membrana. Gracias a ello, estas moléculas son sensibles a los cambios en el potencial de membrana y pueden actuar como transductores del mismo. Nos centraremos en el mecanismo electrocrómico, por ser el que está presente en prácticamente todos los tintes utilizados en aplicaciones de electrofisiología cardíaca, y en concreto en el Di-4-ANNEPS, que como hemos dicho anteriormente, es el más utilizado para este fin. El motivo es que sólo el mecanismo electrocrómico tiene un tiempo de respuesta lo suficientemente rápido. Por ejemplo, la excitación y la emisión de los tintes electrocrómicos requiere aproximadamente  $10^{-12}$  y  $10^{-6}$  ms, respectivamente. Por tanto, el proceso total de la fluorescencia sensible a potencial de membrana ( $10^{-12} + 10^{-6}$  ms) es varios órdenes de magnitud más corto que el cambio más rápido en el potencial de membrana (la fase 0 del potencial de acción que es del orden de 1 ms).<sup>7</sup>

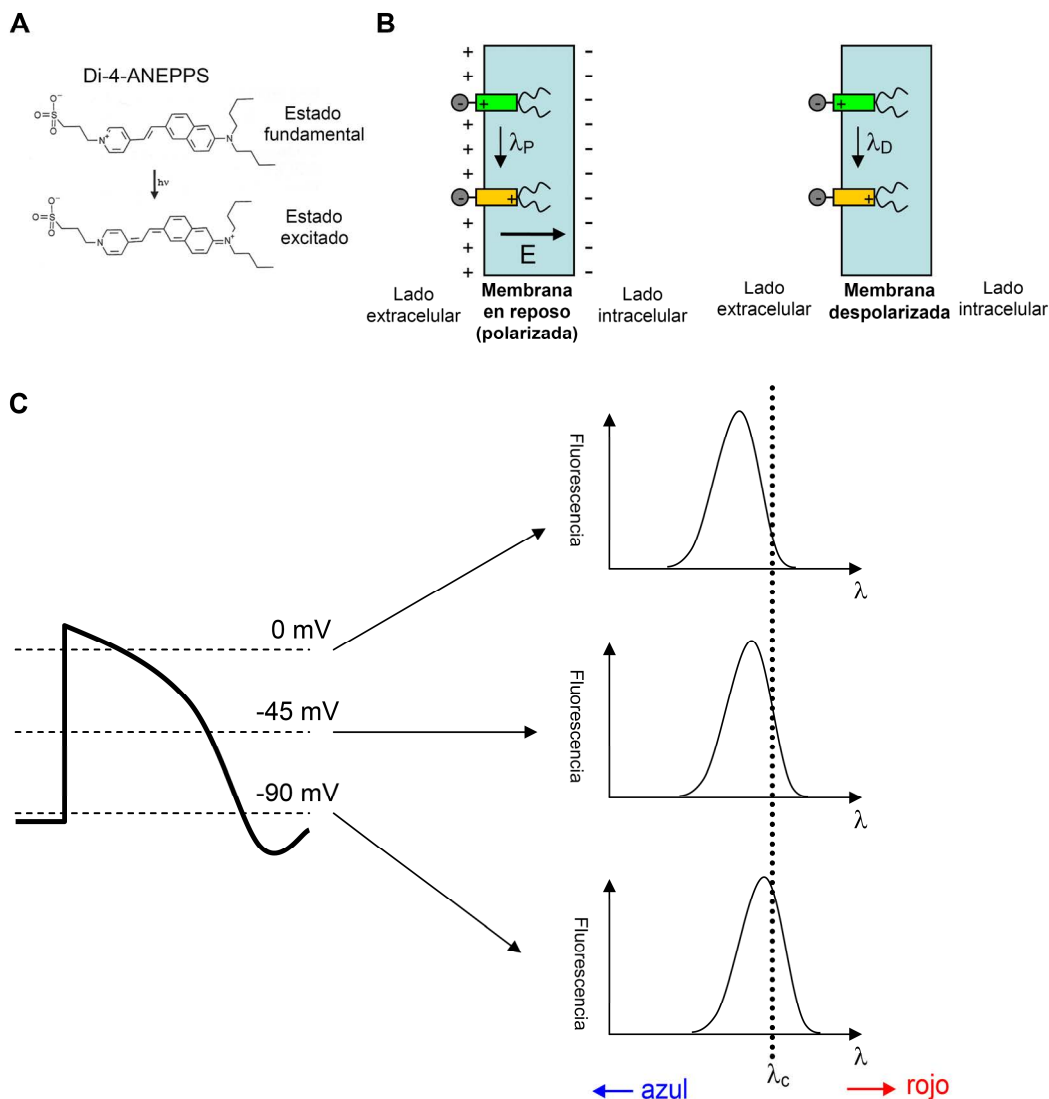
Entremos ahora en mayores detalles. Como resultado de la fotoexcitación se produce una redistribución de carga dentro del cromóforo no simétrica, y de esta forma, el campo eléctrico dentro de la membrana puede cambiar el espectro de emisión de fluorescencia del tinte, sin necesidad de que haya ningún movimiento molecular. Este es el fundamento del mecanismo electrocrómico. El desplazamiento de carga que se produce como resultado de la aplicación de una luz de excitación, hace que el cromóforo pase de su estado fundamental a su estado excitado.<sup>7</sup> En su estado fundamental, el cromóforo tiene su carga positiva localizada en el nitrógeno cerca del extremo *pyridinium* de la izquierda, mientras que en su estado excitado, la carga positiva se sitúa en el nitrógeno cerca del extremo de la fracción anilínica (**Figura 6A**). Además, el extremo correspondiente al grupo  $\text{SO}_3^-$  (hidrofílico), y las cadenas hidrocarbonadas (lipofílicas), se orientan hacia extremos opuestos, y como consecuencia, la molécula se liga a la membrana celular, ya que el *cromóforo* se alinea a lo largo de las moléculas lipídicas de la membrana (**Figura 6B**).<sup>7</sup> Este alineamiento asegura que el desplazamiento de carga electrónica producido como consecuencia de la excitación, sea paralelo a la dirección del campo eléctrico intramembrana. En una membrana polarizada, este acoplamiento del campo eléctrico con el momento dipolar del *cromóforo*, decrementa la energía necesaria entre el estado fundamental y



el excitado. Esto resulta en un “desplazamiento al rojo” tanto del espectro de excitación como del de emisión. Cuando la membrana se despolariza, se produce, por el contrario, un “desplazamiento al azul” de los espectros (**Figura 6C**).<sup>7</sup> Por lo tanto, cuando la fluorescencia se registra una vez que pasa a través de filtros ópticos que seleccionan el rango de las altas longitudes de onda de excitación y emisión (más cercanas al rojo), los potenciales de acción se acompañan de un decremento en el nivel de señal.<sup>7</sup>

Resumiendo el funcionamiento de un tinte sensible a membrana, e insistiendo en los conceptos fundamentales, podemos decir lo siguiente. Para una luz de excitación de intensidad constante y longitud de onda en el rango apropiado, la luz emitida tiene un espectro similar al mostrado en la **Figura 6C**. La propiedad clave de los tintes sensibles a voltaje con mecanismo electrocrómico, es que tienen un espectro de emisión que es dependiente del voltaje. La despolarización de la membrana celular durante la fase 0 del potencial de acción, hace que el espectro de emisión se desplace a menores longitudes de onda (hacia el azul). Típicamente se usa un filtro para seleccionar las longitudes de onda mayores (más cercanas al rojo) que la longitud de onda de corte del filtro (línea vertical en la **Figura 6C**). El desplazamiento en el espectro de emisión cambia la magnitud de la fluorescencia que pasa a través del filtro (zona a la derecha de la línea vertical punteada en la **Figura 6C**), y que es medida por medio de un detector (por ejemplo una cámara CCD o un array de fotodiodos). Como el área de la región de espectro que llega al detector, (es decir, la cantidad de luz que deja pasar el filtro) es inversamente proporcional al potencial de membrana relativo, el detector de luz genera una señal cuya forma refleja la morfología del potencial de acción que la ha originado, aunque invertida en el caso del Di-4-ANEPPS.

En general, para cualquier tipo de fuente luminosa, la exposición a una luz de alta intensidad puede causar fotoblanqueamiento y fototoxicidad en el tejido. Para minimizar estos efectos, la duración de la iluminación debería limitarse a la mínima necesaria. Precisamente con Di-4-ANEPPS no se produce un daño fotodinámico detectable en preparaciones de corazón intacto perfundido, y esto podría hacer llegar a la falsa conclusión de que este tinte no produce daño fotodinámico en absoluto. Sin embargo, cuando se trabaja con células cardíacas aisladas o cultivos de miocitos en monocapas, la intensidad de luz se incrementa normalmente para mejorar la SNR, y en esas condiciones el Di-4-ANEPPS sí que muestra daño fotodinámico a tener en cuenta.<sup>7</sup> Además, el tinte di-4-ANEPPS tiene el inconveniente de que se internaliza rápidamente en las células, ocasionando una disminución de la señal registrada con el paso del tiempo. En cambio, el tinte di-8-ANEPPS se mantiene más tiempo en la capa externa, reduciéndose así la fototoxicidad.<sup>8,9</sup>



**Figura 6.** Mecanismo electrocrómico de respuesta al potencial de membrana. **A:** La porción correspondiente al cromóforo de la molécula sufre un desplazamiento de carga debido al paso desde el estado fundamental al estado excitado, debido a una reorganización de su estructura. Es importante destacar que la molécula contiene un grupo polar en un extremo, y cadenas apolares hidrocarbonadas en el otro. Esto permite que la molécula se alinee de con la estructura de la membrana de tal forma que el *cromóforo* quede paralelo al campo eléctrico intramembrana. **B:** Orientación que toma la molécula al ligarse a la membrana celular donde el cromóforo está representado por el rectángulo de color (verde en estado fundamental, naranja en estado excitado). El extremo polar es el círculo gris (que tiene carga negativa), y al otro extremo se representan las cadenas hidrocarbonadas. El campo producido en el interior de la membrana polarizada, disminuye la diferencia de energía entre los estados fundamental y excitado, por lo que se produce un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda mayores (hacia el rojo). **C:** El espectro de emisión de la molécula sensible a voltaje cambia con el potencial de membrana. Cuando la célula se despolariza desde su potencial de reposo (-90 mV) hacia potenciales menos negativos (-45 y 0 mV respectivamente en la figura), el espectro de emisión se desplaza progresivamente hacia longitudes de onda menores (hacia el azul). El filtro de emisión situado delante del detector, excluirá la luz emitida por el tinte por debajo de una cierta longitud de onda  $\lambda_c$ , que aparece representada como una línea vertical punteada. Como la cantidad de luz que alcanza el fotodetector está relacionada con el área de espectro que queda a la derecha de  $\lambda_c$ , la intensidad de fluorescencia registrada estará relacionada de manera inversa con la tensión transmembrana.

Por otra parte, el Di-4-ANEPPS ha visto limitada su utilidad para la perfusión con sangre debido a la dispersión de la luz y a la alta absorción de los cromóforos y de la hemoglobina con longitudes de onda de excitación onda verdes.<sup>10</sup> Se ha probado que la utilización de longitudes de onda largas (cercanas al infrarrojo, y a las que el tejido y la sangre son más “transparentes”) tanto para emisión como excitación, puede minimizar este problema, permitiendo la perfusión con sangre e incluso mejorando el registro de capas profundas del tejido. Entre estos tipos de tintes se encuentran los tintes sintetizados y caracterizados en el laboratorio del Dr. Salama,<sup>11</sup> los llamados Pittsburgh I-VIII, y más recientemente los tintes di-4-ANBDQPQ y di-4-ANBDQBS desarrollados por el Dr. Loew.<sup>10</sup> Además, son compatibles con otros tintes y se obtiene una mejor calidad de señal en comparación con el di-4-ANEPPS cuando se utilizan tanto con Tyrode como con sangre.<sup>12</sup> Tienen la ventaja añadida de que el decaimiento de la señal emitida debido a la internalización del tinte es de 5 a 7 veces más lento que en el caso del di-4-ANEPPS.<sup>10</sup>

#### 1.2.4 Fuentes de luz

La fuente de luz es uno de los elementos más importantes que afectan a la calidad de la señal y a la cantidad de ruido en un sistema óptico. Habitualmente se han utilizado 3 clases de fuentes de luz para medir los potenciales de acción en el músculo cardíaco: las lámparas tungsten-halogen de filamentos, los láseres, y más recientemente, los diodos emisores de luz (LED). De hecho, los dos primeros tipos están cayendo en desuso gracias a las interesantes propiedades de la iluminación LED.

En relación con la fuente de luz utilizada hay que tener en cuenta aspectos como las características de ruido, la homogeneidad del haz de excitación, y la intensidad. Además de estos, son factores de decisión a la hora de decidirse por uno u otro tipo, el tipo de preparación, el tamaño del área a estudiar, la SNR deseada y, por supuesto, el coste.<sup>7</sup>

Los láseres son capaces de proporcionar puntos de luz monocromática (una única longitud de onda) de alta intensidad. La luz monocromática pura de los láseres, a menudo no abarca de manera precisa un cierto ancho de banda alrededor de la longitud de onda del pico de excitación de la molécula de tinción, por lo que excita un estado de menor energía de la molécula. Por ello, con los tintes que tienen un espectro de excitación ancho, la luz de láser es menos eficiente para elevar el estado energético de las moléculas a un estado excitado en el que emiten fluorescencia. Como ventaja, los láseres presentan una alta intensidad por unidad de área, sobre todo para haces de excitación estrechos (de menos de 1 mm de diámetro). Existen varios láseres que se utilizan habitualmente para excitar el Di-4-ANEPPS y el RH-237, con longitudes de onda de 488, 514 y 532 nm. De todas las fuentes de luz, los láseres generan la intensidad luminosa más alta. Sin embargo, típicamente también tienen un ruido mayor.<sup>7</sup> Por lo tanto, un aumento en la intensidad de luz causa un incremento proporcional en el nivel de ruido,

y no supone mejora de la SNR. Existen algunos modelos avanzados que son la excepción a esta regla. Su desventaja es que tienen un coste muy elevado.

En los trabajos presentados en los **Capítulos 3 y 4** de esta Tesis, se utilizaron lámparas de filamento. De los tipos de fuentes de luz, éste era el que proporcionaba una luz más estable, hasta que se generalizó el uso de LEDs. Sin embargo, estas lámparas de filamento tienen el inconveniente de ofrecer una baja intensidad de iluminación por unidad de área en comparación con los láseres. Las lámparas de proyección consisten en un filamento en el punto focal de un espejo parabólico que produce una luz de excitación particularmente estable y de alta intensidad en el rango del visible. Están disponibles comercialmente en una gran variedad de potencias de emisión (centenares de vatios). Ofrecen una intensidad moderada y un espectro plano en el rango del visible, lo que proporciona una gran flexibilidad a la hora de elegir la longitud de onda de excitación mediante el filtro óptico adecuado. Las bombillas de Tungsten-Halogen tienen un tiempo de vida largo, bajo coste, y un nivel de ruido bajo. Si se combina con una fuente de alimentación de continua estabilizada es posible conseguir niveles de ruido de aproximadamente 0,01 % rms. La luz de la lámpara pasa a través de un diafragma situado en el plano focal de un espejo para enfocar. Esta luz se recoge con unas lentes que condensan y enfocan sobre la superficie del corazón.<sup>7</sup> Estas lámparas se mantienen encendidas durante el tiempo en que se efectúan los registros del CO, y se apagan cuando no se están efectuando registros para evitar un calentamiento excesivo. Una vez encendidas, las lámparas alcanzan una temperatura de funcionamiento estable en pocos segundos, de tal manera que no hay que esperar mucho para comenzar los registros de CO.

En principio, por sus características, este tipo de fuente de iluminación era la primera elección en los sistemas de CO, hasta que las buenas propiedades de la iluminación LED han hecho que ésta haya sustituido a las lámparas de filamento como primera elección. Esto se debe a que son muy estables y de fácil uso. Además, permiten una conmutación rápida de longitudes de onda, propiedad muy importante a la hora de registrar múltiples parámetros simultáneamente en CO con un solo detector.<sup>13, 14</sup> Si el lector está interesado en dicho tipo de sistemas LED, puede consultar un proyecto fin de máster co-dirigido por el doctorando y que se reproduce en el **Apéndice C** de esta Tesis.<sup>13</sup> En dicho proyecto, se diseñó, implementó y validó un sistema de iluminación LED conmutado que permitía el registro de potenciales transmembrana y transitorios de calcio con una sola cámara CCD.<sup>13</sup>

### 1.2.5 Filtros ópticos

Un montaje típico de CO tiene al menos 2 filtros ópticos: uno de excitación, y uno de emisión. El filtro de excitación sirve para seleccionar la porción del espectro luminoso que es más eficiente para la excitación de un tinte sensible a voltaje. Este filtro no es necesario si se utiliza un láser para la excitación, ya que éste permite seleccionar con precisión la longitud de onda a utilizar.

El propósito del filtro de emisión es separar la fluorescencia emitida, de la luz de excitación reflejada en la superficie del corazón, la cual habitualmente es de mucha mayor intensidad que la fluorescencia emitida por los tintes. Además, en el caso de los tintes potenciométricos como el Di-4-ANEPPS, sirve para dejar pasar una mayor o menor porción del espectro de emisión de la molécula, ya que como vimos, éste varía con el potencial de membrana (**Figura 6C**).

Las características del filtro se deben seleccionar para que concuerden con las características espectrales de los tintes. Por ejemplo, para el Di-4-ANEPPS, el filtro de excitación debería ser un filtro paso banda centrado cerca de los 500 nm (verde), con una anchura de aproximadamente 50 nm. El filtro de emisión suele ser un filtro que deja pasar las longitudes de onda largas (filtro paso largas, hablando en longitudes de onda), o lo ue es equivalente, las bajas frecuencias (filtro paso bajo, si hablamos en frecuencias). En el caso del Di-4-ANEPPS se suele utilizar una longitud de onda de corte de aproximadamente 620 nm. Si se utiliza espejo dicróico (como en el montaje de la **Figura 2B**), debería tener la longitud de onda de corte en alguna longitud de onda intermedia, por ejemplo a 590 nm en el caso del Di-4-ANEPPS.

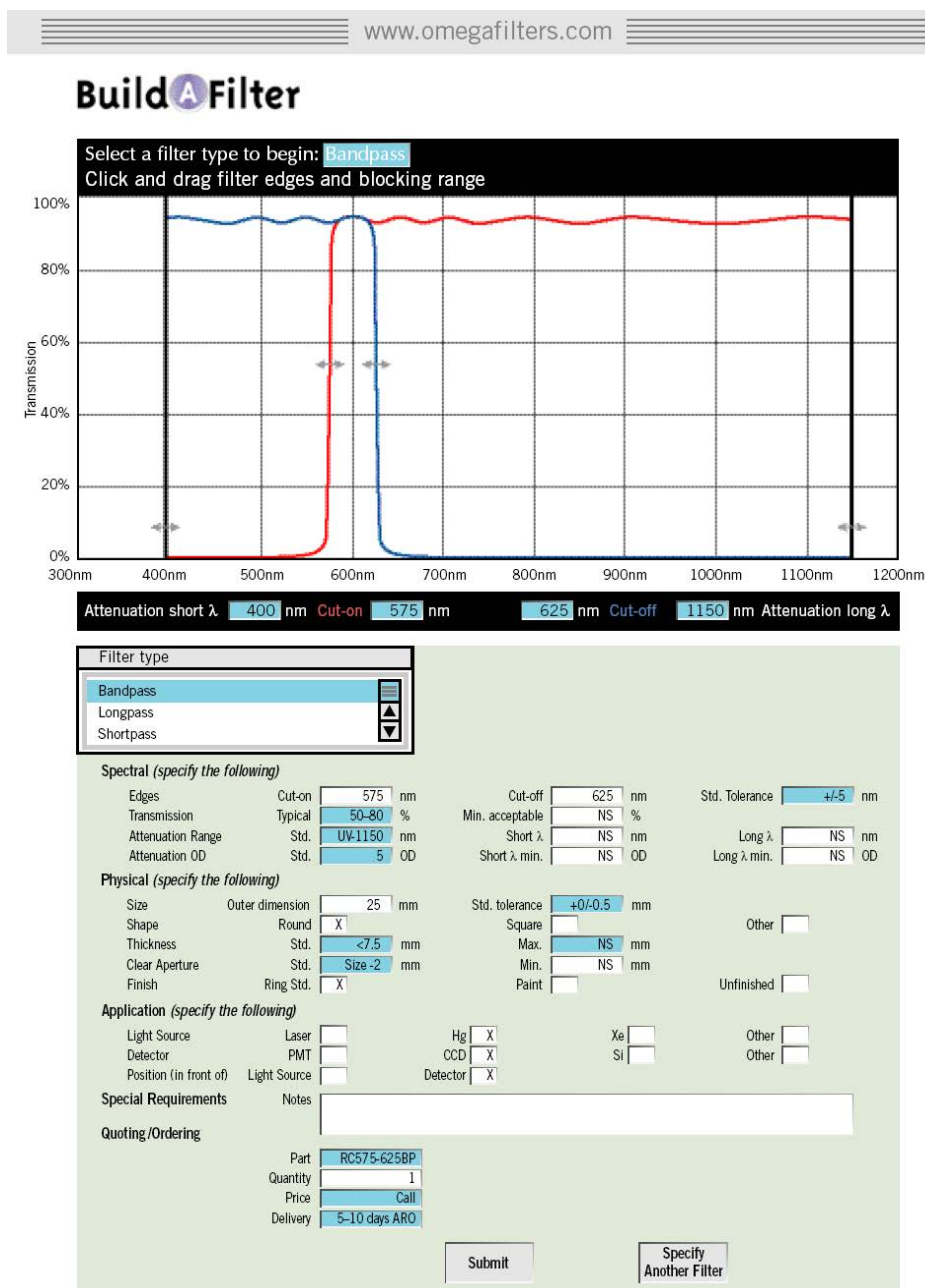
En cuanto a las tecnologías utilizadas, como filtros de excitación y de emisión se pueden utilizar filtros de “cristal coloreado”, o filtros de interferencia. Los últimos son más caros, pero proporcionan bandas de transición más abruptas, una mayor transmisión de la luz en la banda de paso, y una mayor flexibilidad para seleccionar su función de transferencia. Hay varias empresas que pueden proporcionar filtros de interferencia de alta calidad con las propiedades espectrales deseadas, por ejemplo Chroma Technology Group, y Omega Optical Inc. Estas compañías permiten encargos online totalmente personalizados gracias a una aplicación en línea como la presentada en la **Figura 7**.

### 1.2.6 Lentes

La técnica de CO requiere la captación de la fluorescencia emitida por la preparación, que en general ofrece una baja intensidad. Por tanto se debe maximizar la eficiencia en la captación de fluorescencia, para permitir distinguir la proveniente de los potenciales de acción, frente a la fluorescencia de fondo.

Cuando se utiliza una lente para enfocar una imagen en un fotodetector, maximizar la eficiencia en captura de la fluorescencia es particularmente importante con altos factores de aumento, cuando la fuente de fluorescencia es más reducida (es decir, relativamente pocas células contribuyen a la señal óptica). La fuente de cada potencial de acción óptico se deriva de un punto minúsculo de tejido que puede estar compuesto desde 1 célula, hasta cientos de células cardíacas, dependiendo del factor de aumento utilizado. Por ello, un potencial de acción registrado ópticamente, representa el potencial promedio de un agregado de células vecinas.

Cuanto mayor es el factor de aumento, más pequeño es el punto de tejido del cual se obtienen los potenciales, y más parecido será el potencial de acción registrado al de una única célula.<sup>7</sup>



**Figura 7.** Aplicación web de la empresa Omega Optical para el diseño de filtros ópticos de interferencia a medida. Los parámetros fundamentales a elegir son: tipo de filtro, longitudes de onda de corte y características físicas (dimensiones, forma, si debe ser enroscable en alguna lente fotográfica etc.).

Las lentes fotográficas son apropiadas para factores de aumento por debajo de 10x, permitiendo registrar potenciales de acción de preparaciones en corazón completo. La preparación se sitúa a una distancia específica del plano focal de la lente. El fotodetector se sitúa

al otro lado de la lente, justo en la posición en que se forma la imagen. Los sistemas de lentes de cámara fotográfica, tienen la ventaja de ser simples, y además, son suficientes para la mayoría de las aplicaciones.<sup>7</sup>

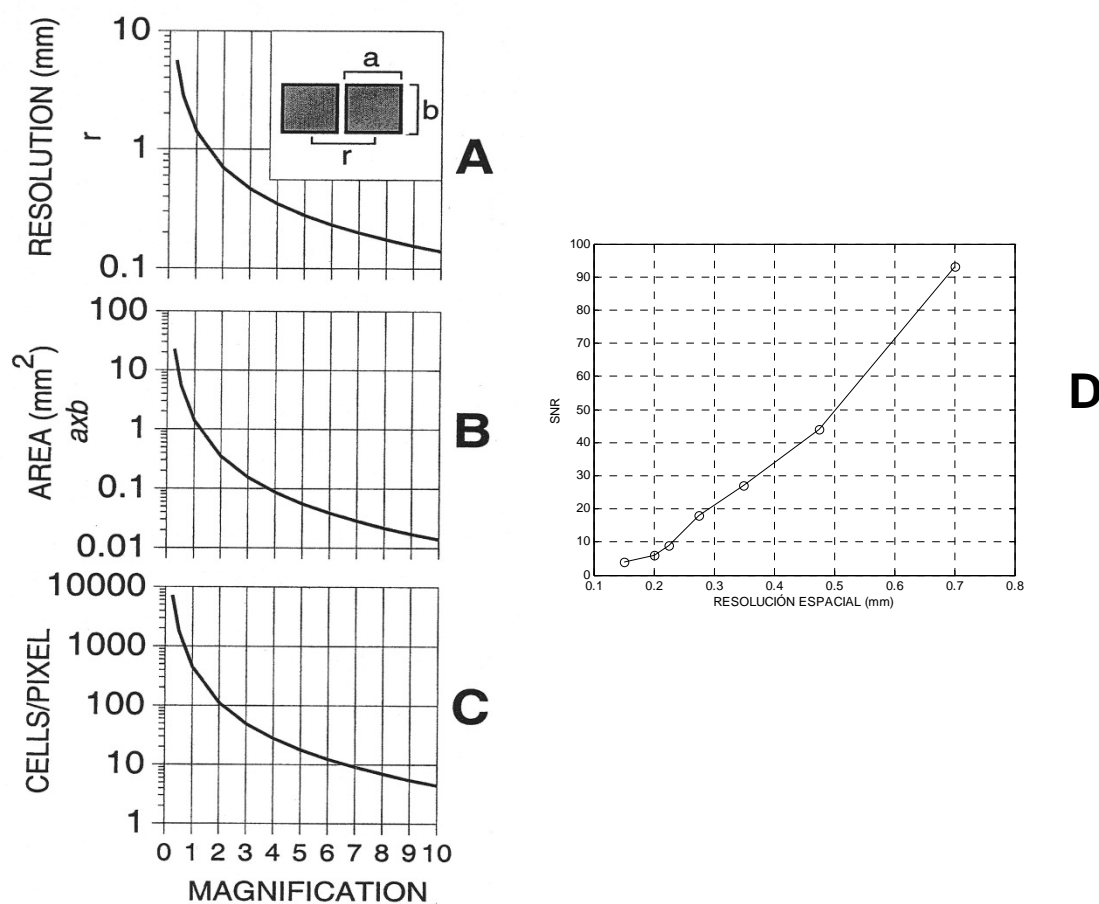
Como hemos dicho, la fuente de los potenciales de acción ópticos es un cierto volumen de células que depende, entre otros factores, del factor de aumento  $M$ . Esta propiedad confiere a los potenciales de acción ópticos una serie de características que los diferencian sustancialmente de electrogramas y de los potenciales de acción obtenidos con microelectrodos. Además, como es lógico, el factor de aumento  $M$ , junto con el área de los elementos receptores (por ejemplo, píxeles en cámaras CCD y CMOS) influye en la resolución espacial del sistema.<sup>7</sup>

La **Figura 8A** muestra el efecto de  $M$  en la resolución espacial  $r$ , considerada esta como la distancia entre los centros de las zonas de tejido correspondientes a elementos de registro vecinos en el detector (píxeles en cámaras CCD y CMOS). Como cabría esperar, al aumentar  $M$ , mejora la resolución espacial (es decir, disminuye  $r$ ), puesto que cada elemento de registro del detector recibe fotones de una parte más pequeña de tejido. De manera similar, el área de tejido registrada por cada elemento del detector, así como el número de células que intervienen en la creación del potencial de acción óptico, disminuyen al aumentar  $M$ , como se puede ver en las **Figuras 8B y 8C**. Por lo tanto, cuando la resolución espacial se mejora aumentando  $M$  (es decir,  $r$  disminuye), la fuente del potencial de acción óptico, y por tanto, la amplitud del potencial de acción registrado, decrecen rápidamente. Así, al aumentar  $M$ , como un número menor de células están contribuyendo a la señal del potencial de acción óptico de cada elemento del detector, la SNR se decrementa rápidamente al mejorar la resolución espacial, como se muestra en la **Figura 8D**. Por tanto, la mejora de la resolución espacial siempre se obtiene a costa de una disminución en la SNR.<sup>15</sup>

Veamos ahora el efecto que tiene  $M$  sobre la forma de la fase 0 del potencial de acción. Para ello debemos tener en cuenta, que como se ha dicho, un potencial de acción óptico representa el promedio espacial de los potenciales transmembrana de las células dentro de un volumen de tejido. Por ello, un decremento de  $M$  significará que van a contribuir más células al potencial de acción óptico. Así, los factores de aumento  $M$  bajos, producen un alargamiento de la fase 0 del potencial de acción óptico (es decir, una menor pendiente de activación), como muestra la **Figura 9A**. En ella, se muestra el tiempo de subida del potencial de acción óptico (es decir, la duración de la fase 0) con un factor de magnificación relativamente bajo (1x), con uno intermedio (3x) y con uno bastante alto (9x), y se comparan con el de una única célula de la misma región, registrado con microelectrodos.<sup>15</sup>

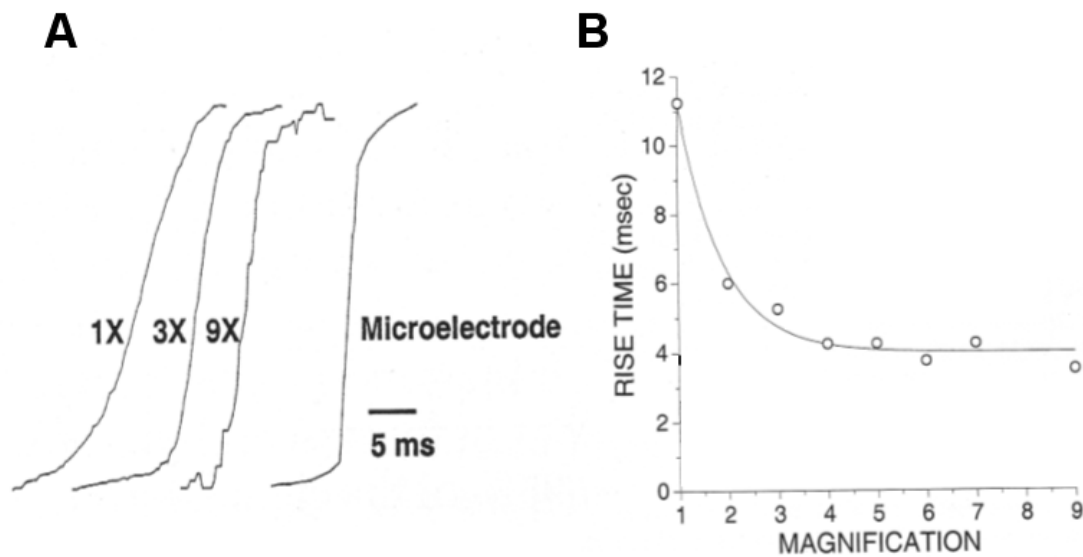
Está claro que cuanto mayor es el factor de aumento  $M$ , la forma y duración de la fase 0 del potencial de acción óptico se aproxima más a la registrada en una sola célula con microelectrodos, aunque también se puede ver como al aumentar  $M$ , disminuye la SNR, y se

obtienen señales más ruidosas. Estos se muestra cuantitativamente en la **Figura 9B**, en la que se representa el tiempo de subida del potencial de acción registrado ópticamente (círculos blancos) frente a  $M$ .<sup>15</sup>



**Figura 8.** **A:** Influencia del factor de aumento óptico ( $M$ ) en la resolución espacial. **B:** Influencia de  $M$  en el área de tejido correspondiente a un solo píxel del detector. **C:** Influencia de  $M$  en el número estimado de células que contribuyen a generar la señal en cada píxel del detector. En los 3 casos, la variación es inversa al factor de magnificación  $M$ . Las cuentas se han realizado considerando píxeles bidimensionales (es decir, se ha ignorado la profundidad de campo de cada píxel, por ser despreciable en la mayoría de los casos). **D:** Relación señal a ruido en función de la resolución espacial. Se observa como al empeorar la resolución espacial, la SNR mejora, debido a que un mayor número de células contribuyen al potencial de acción óptico. Adaptado de la referencia <sup>15</sup>

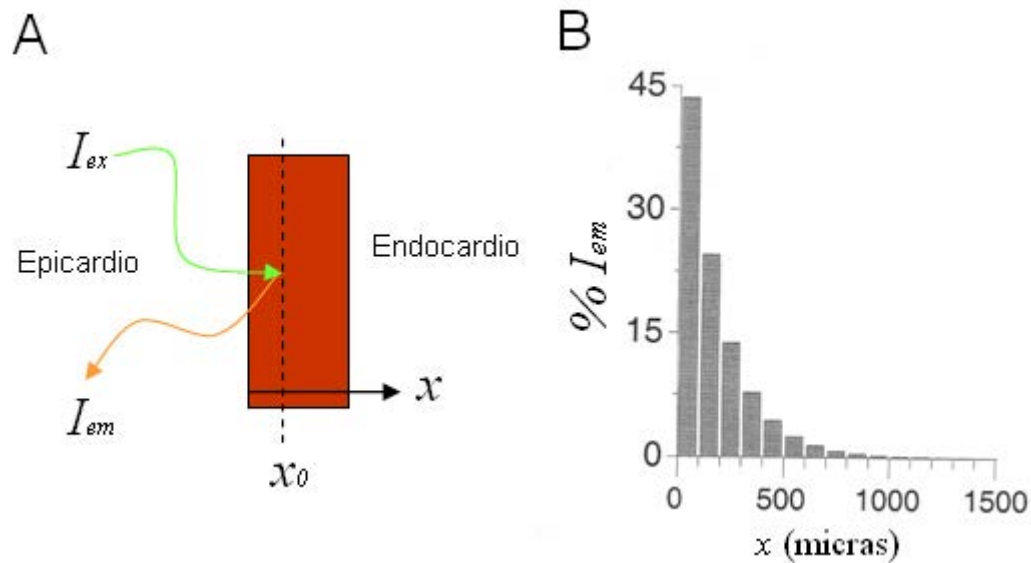




**Figura 9. A:** Fase 0 de los potenciales de acción ópticos registrados con un factor de aumento de x1, x3 y x9, y su comparación con la fase 0 de un potencial de acción óptico registrado con microelectrodos. Se observa como cuanto mayor es la magnificación, la fase 0 del potencial de acción óptico se aproxima más a la registrada en una sola célula con microelectrodos. Esto se debe a que al aumentar M, disminuye el número de células que contribuyen al potencial de acción óptico. También se observa, como por este mismo motivo, al aumentar M, disminuye la SNR. **B:** Duración de la fase 0 de los potenciales de acción ópticos en función del factor de magnificación utilizado. De nuevo se observa como al aumentar M, disminuye la duración de la fase 0. Adaptado de la referencia <sup>15</sup>.

Como la luz puede penetrar dentro del tejido cardíaco, la fuente de los potenciales de acción ópticos incluye también una contribución de las capas más profundas de tejido. La luz de excitación debe penetrar primero a las capas más profundas, y desde ellas se originará luz fluorescente que saldrá desde la superficie del corazón. Para determinar la contribución de las capas más profundas, en un trabajo se caracterizaron las propiedades de transmisión de luz del miocardio ventricular.<sup>15</sup>

La **Figura 10** muestra el porcentaje de fluorescencia originado por cada capa de grosor 100  $\mu\text{m}$ . Aproximadamente el 95% de la señal detectada en la superficie epicárdica, se origina desde profundidades de tejido inferiores a las 500  $\mu\text{m}$ , y de ese 95% la mayoría viene de las primeras 100  $\mu\text{m}$ .<sup>15</sup> Teniendo en cuenta esto, se puede considerar que la fuente de los potenciales de acción ópticos es esencialmente una capa bidimensional de células.



**Figura 10. A:** Para obtener un potencial de acción generado por una célula localizada a una profundidad  $x_0$  por debajo de la superficie epicárdica, la luz de excitación ( $I_{ex}$  de 540 nm) debe penetrar a través del tejido para excitar el tinte sensible a potencial de membrana ligado a dicha célula. A la vuelta, la luz emitida por el tinte ( $I_{em}$ ), debe escapar a través del tejido hacia la superficie epicárdica. Como la luz de excitación y emisión decaen exponencialmente con la profundidad, la contribución de las células subepicárdicas a los potenciales de acción ópticos se atenúa como el producto de esos dos procesos exponenciales. **B:** Porcentaje de intensidad de fluorescencia emitida que proviene de cada 100  $\mu\text{m}$  de tejido. Se observa como el mayor porcentaje de dicha fluorescencia proviene de las primeras capas. Adaptado de la referencia.<sup>15</sup>

### 1.2.7 Fotodetectores

En CO se utilizan varios tipos distintos de dispositivos para detectar la fluorescencia emitida por las moléculas del tinte aplicado al corazón tras ser excitadas por una luz de la longitud de onda apropiada. Los factores que harán elegir un tipo u otro para el sistema de CO serán principalmente los requisitos de resolución espacial y temporal. También influirán otros requisitos como la eficiencia cuántica del sistema de detección, ya que la SNR será proporcional al número de fotones medidos. También habrá que considerar como un factor importante el ruido *shot* del detector, puesto que limita la SNR.<sup>7</sup>

Actualmente existe un número limitado de fotodetectores que ofrecen una sensibilidad y una resolución espacio-temporal adecuadas para el CO cardíaco. Las tecnologías más utilizadas son los arrays de fotodiodos (PDA), tubos fotomultiplicadores (PMT), y sobre todo, las cámaras CCD (*Charge-Coupled Device*) y las cámaras CMOS (*Complementary MetalOxide Semiconductor*).<sup>7</sup>

#### Arrays de fotodiodos y tubos fotomultiplicadores

Los PDAs contienen cientos de fotodiodos que son sensores individuales que transforman la luz en corriente eléctrica, de tal forma que ésta es proporcional a la intensidad de

luz recibida. Los PMT pueden llegar a conseguir factores de multiplicación de  $10^3$  a  $10^9$  mediante la emisión secundaria, por lo que pueden responder a niveles muy bajos de iluminación con un nivel de ruido aceptable. En cambio, su eficiencia cuántica está entre el 20 % y 30 %, siendo generalmente mayor para longitudes de onda entorno al azul y menor entorno al rojo. Los PDA y PMT ofrecen una resolución temporal alta, pero baja resolución espacial,<sup>7</sup> por lo que son poco utilizados en la actualidad.

### Cámaras CCD

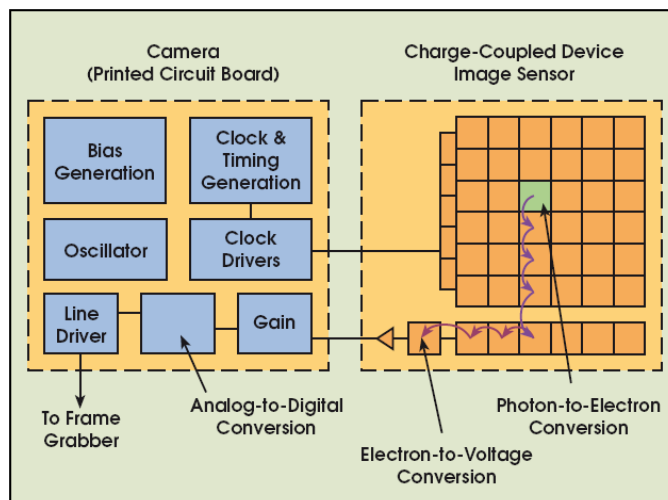
Actualmente uno de los sensores más utilizados son las cámaras CCD (*charge-coupled device*). En los trabajos presentados en los **Capítulos 3 y 4** de esta Tesis se utilizó una cámara CCD. El sensor CCD es un dispositivo construido con semiconductores, que ha sido segmentado en un array de píxeles sensibles a la luz. Un sensor CCD puede contener cientos de miles de píxeles, permitiendo una resolución espacial en principio mucho mayor que la obtenible mediante un PDA o un PMT.

El funcionamiento, a nivel muy básico, es el que sigue. Cuando un fotón colisiona con un píxel del sensor CCD, libera un electrón, que es almacenado dentro de dicho píxel. El número de electrones acumulados durante el tiempo de integración, es directamente proporcional a la intensidad de la luz incidente y al tiempo de integración. Cuanto mayor sea el tiempo de integración, mayor será la carga almacenada, y por tanto, la amplitud de la señal generada. Sin embargo, demasiada luz, o un tiempo de integración demasiado elevado, pueden saturar la capacidad de carga de un píxel. Además, tiempos de integración demasiado grandes pueden hacer que la imagen registrada se vea borrosa.

Después del tiempo de integración, los propios elementos del CCD sirven como *pipelines*, trabajando para transmitir las cargas al amplificador *read-out*, donde son convertidas secuencialmente a voltajes, y digitalizadas (**Figura 11**). Típicamente se utiliza un único amplificador de *read-out* para el array CCD completo, lo que permite fabricar arrays con un número muy elevado (hasta varios millones) de pequeños (5-20  $\mu\text{m}$ ) elementos fotosensibles.

En general el tiempo requerido para almacenar las cargas que van a dar lugar a una imagen, y la posterior lectura de cada píxel individual, determina la frecuencia de muestreo. Dado que un sensor CCD puede contener varios cientos de miles o millones de píxeles, y que los píxeles son leídos secuencialmente, el tiempo de lectura es el principal factor que limita la frecuencia de muestreo en los sistemas CCD. En algunas configuraciones, es posible leer una imagen, mientras se están almacenando las cargas que darán lugar a la siguiente, y esto permite incrementar la frecuencia de muestreo. También es posible reducir significativamente la tasa de muestreo, reduciendo el número de píxeles leídos mediante la combinación de píxeles adyacentes en superpíxeles (*pixel binning*). Como el área de un píxel de un sensor CCD es pequeña comparada con la de un fotodiodo, el *pixel binning* tiene también la ventaja de

incrementar el área efectiva del píxel, y de esta manera, el nivel de la señal obtenida en relación con el ruido, eso sí, a costa de perder resolución espacial.



**Figura 11.** Esquema de funcionamiento de un sensor CCD. La mayoría de las funciones se llevan a cabo en la placa de circuito impreso de la cámara. Si la aplicación requiere algún cambio, se puede rediseñar la electrónica sin cambiar el sensor.<sup>16</sup>

Los sensores CCD están en todas las videocámaras de consumo actuales, y están siendo también muy usados en cámaras de investigación. Como resultado, existe una amplia gama de cámaras y sistemas de adquisición disponibles comercialmente. La eficiencia cuántica de los mejores chips CCD actuales se aproxima o supera el 90%. La cantidad de carga máxima que se puede acumular en un píxel individual está limitada por la capacidad *full well* del CCD, lo que determina el nivel de saturación de la cámara y su rango dinámico: diferencia entre el nivel de saturación (intensidad máxima registrable) y el nivel de ruido del propio sensor (intensidad mínima registrable). Los sensores CCD tienen en general un rango dinámico bajo, que hace difícil capturar fluorescencias de fondo grandes a la vez que se proporciona una adecuada resolución en voltaje al potencial de acción (recordemos que los potenciales de acción se ven como pequeñas variaciones de hasta un 10% siendo muy optimistas sobre un nivel de fluorescencia de fondo mucho mayor, de alrededor del 90%). Esto es debido a que las videocámaras normalmente no poseen la capacidad de eliminar la fluorescencia de fondo antes de la digitalización. Esto conlleva que para conseguir que el ruido introducido por el conversor analógico/digital (A/D) tenga un nivel lo suficientemente bajo, éste idealmente debería tener una resolución de 16 bits. En cualquier caso, las mejoras recientes en la tecnología CCD han incrementado de manera muy importante el rango dinámico, y de esta forma, la SNR alcanzable mediante un detector de este tipo.

Su principal ventaja, por tanto, es la alta resolución espacial que se puede conseguir debido al gran número de píxeles en un sensor CCD. Sin embargo, la frecuencia de muestreo

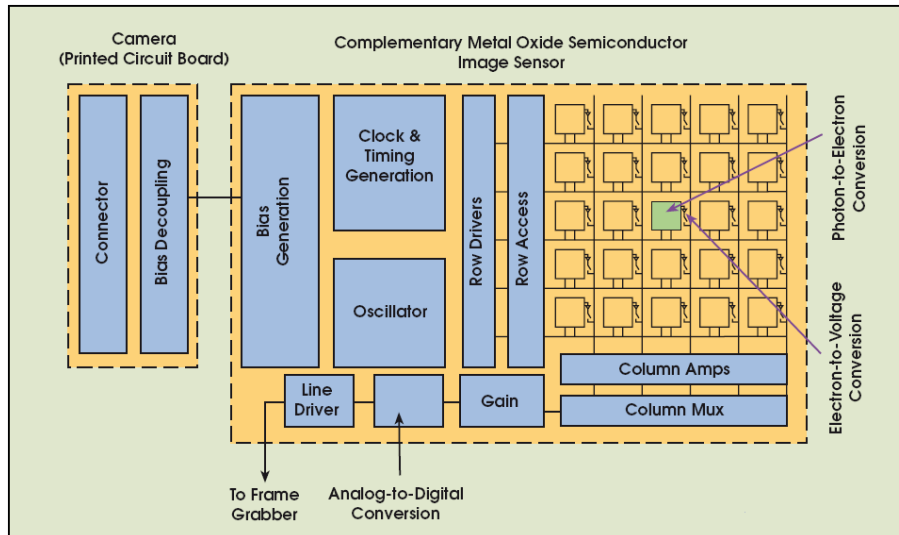
usualmente es algo baja, aunque se puede incrementar con *pixel binning*, pero esto, como hemos dicho, limita la principal ventaja de la tecnología CCD, que precisamente es su alta resolución espacial. En cualquier caso se han conseguido modelos que obtienen un compromiso resolución espacial – resolución temporal muy razonable. Por ejemplo una cámara CCD DALSA de 128x128 píxeles con una frecuencia de muestreo de 490 imágenes por segundo (fps), o el modelo que utilizamos nosotros en nuestro laboratorio de CO, una cámara DALSA que tiene 64x64 píxeles (tras un *binning* de 2x2) con una frecuencia de muestreo de hasta 1000 fps. Una de las cámaras CCD más avanzadas para estas aplicaciones es una de RedShirtImaging (Farfield, CT) con 80x80 píxeles y una frecuencia de muestreo de 2000 fps. Se puede incrementar dicha frecuencia de muestreo incluso más con *binning*. En un modo *binning* de 3x3 (26x26 superpíxeles), la cámara es capaz de funcionar a 5000 fps.

### Cámaras CMOS

Las cámaras CMOS también son una opción interesante debido al gran número de píxeles de los que disponen y a las altas frecuencias de adquisición de datos de las que son capaces.<sup>12</sup> Tanto los sensores CCD como los CMOS están fabricados con materiales semiconductores de metal-óxido (MOS) y estructurados en forma de matriz. Acumulan una carga eléctrica en cada celda de la matriz (o píxel) en proporción a la intensidad de luz que incide sobre ella.<sup>16</sup>

La principal diferencia de funcionamiento entre estas dos tecnologías es que cuando el tiempo de exposición ha terminado, los sensores CCD (**Figura 11**) transfieren cada carga del píxel, mediante desplazamientos sucesivos y de forma secuencial, hacia una estructura de salida común, que transforma la carga a voltaje y lo entrega a la circuitería de la cámara donde la señal se digitaliza.<sup>16</sup> En cambio, en los sensores CMOS (**Figura 12**), los fotones que recibe cada celda son convertidos en carga eléctrica y en voltaje en la misma celda receptora, por lo que las celdas son independientes unas de otras.<sup>16</sup> Estas diferencias en las técnicas de lectura de datos tiene implicaciones significativas en la arquitectura del sensor y, por tanto, en sus capacidades y limitaciones.<sup>16</sup>

Las principales ventajas de las cámaras CCD es que tienen un mayor rango dinámico (razón entre el nivel de saturación de los píxeles y el umbral por debajo del cual no captan señal porque es inferior a su propio ruido), menor ruido y proporcionan una respuesta uniforme, es decir, un píxel sometido al mismo nivel de excitación de luz que sus vecinos no presenta cambios apreciables. En cambio, las cámaras CMOS permiten utilizar mayores velocidades de adquisición, registrar sólo una región de interés, no presentan efecto “*blooming*” (fenómeno por el cual un píxel que ha alcanzado la saturación empieza a ‘contagiar’ a sus vecinos) y tienen una alta eficiencia cuántica, es decir, con poca luz se puede conseguir un nivel de señal aceptable.<sup>16</sup>



**Figura 11.** Esquema de funcionamiento de un sensor CMOS. La conversión carga-voltaje tiene lugar en cada píxel, y la mayoría de las funciones están integradas dentro del sensor.<sup>16</sup>

Llegados a este punto de la introducción, ya sabemos cómo se generan las películas de activación del tejido cardíaco gracias a la técnica del CO. Recordemos que la evolución temporal de la intensidad de luz registrada en cada píxel, corresponde con los potenciales de acción ópticos de la zona de tejido correspondiente a ese píxel. El que a dicho píxel corresponda una zona más grande o más pequeña del tejido cardíaco, vendrá determinado por la óptica del sistema, que también condiciona como hemos visto, la resolución espacial del mismo. A mayor factor de aumento, mejor resolución espacial (cada píxel corresponde a una región de tejido más pequeña), pero como contribuyen menos células al potencial de acción óptico, la SNR empeora. En cuanto a la resolución temporal, viene fijada básicamente por el tipo de detector utilizado: las mejores frecuencias de muestreo se consiguen con los PDA y las cámaras CMOS, sin embargo, las cámaras CCD han conseguido frecuencias de muestreo lo suficientemente elevadas como para ser útiles para este tipo de aplicaciones, y tienen como ventaja la posibilidad de una resolución espacial mejor que la obtenible con PDA o PMT.

## 1.3 Acondicionamiento de las señales obtenidas mediante CO

### 1.3.1 Filtrado espacio-temporal

La relación señal a ruido (SNR, cociente entre la potencia de señal y la potencia de ruido) de las películas de activación no suele ser demasiado buena en las películas “crudas” ya las variaciones de fluorescencia debidas al potencial de acción, representan un porcentaje muy pequeño de la fluorescencia total emitida por la preparación. Por ello, se hace necesario efectuar tanto filtrados temporales, como espaciales, con el objetivo de reducir el nivel de ruido y mejorar la SNR. A pesar de los esfuerzos para mejorar la SNR, aún existirán zonas de la imagen donde

la señal siga siendo mala. Por ese motivo, y para que no introduzcan errores en los resultados de las mediciones, esas zonas se enmascaran. Por fin, una vez se ha mejorado la SNR a un nivel aceptable, y se ha realizado el enmascarado de las zonas problemáticas cuando es necesario, se realiza un procesamiento digital de las señales del que hablaremos en el **apartado 1.4** posterior.

Caracterizar el espectro espacio-temporal de los potenciales de acción ópticos es algo necesario para poder elegir de una manera racional, los filtrados temporales y espaciales que se pueden realizar sobre las señales registradas. Además es posible caracterizar la distorsión que introducen dichos filtrados, y estudiar si compensa o no asumirla a cambio de lo grande que sea la mejora obtenida en la SNR. El tipo de filtrado que usamos en los **Capítulos 3 y 4** se basa en un estudio donde *Mironov et al.*<sup>17</sup> analizan estas cuestiones. En dicho trabajo, se estudió la evolución temporal del espectro espacial de un frente de onda propagándose desde un punto de estimulación situado en la pared del ventrículo derecho en un corazón de cerdo en sistema Langendorff, y teñido con Di-4-ANEPPS. Sus conclusiones principales son:

- Las componentes espectrales espaciales de longitud de onda espacial  $< 3$  mm (altas frecuencias espaciales) son debidas fundamentalmente a ruido y características físicas de la superficie filmada, como grasa, tejido conectivo, vasos coronarios etc.
- El espectro temporal de los potenciales de acción ópticos carece de componentes de alta frecuencia, mayores de 100 Hz

La ausencia de componentes espectrales de alta frecuencia permite el uso de filtros paso-bajo bastante agresivos, tanto temporales como espaciales, sin afectar apenas a la morfología de los potenciales de acción. Los autores citan ejemplos en los que se logró aumentar la SNR hasta 150 veces, con menos de un 3% de distorsión.

Para el cálculo de los coeficientes del filtrado espacial, se utilizó una ventana triangular (Bartlett). El peso es máximo en el píxel central, y decrece linealmente hacia los bordes de la máscara de convolución, es decir:

$$w(i, j) = \begin{cases} 1 - \sqrt{\frac{k^2 + l^2}{m^2}}, & \text{si } k^2 + l^2 < m^2 \\ 0, & \text{resto} \end{cases}$$

donde  $m$  es el tamaño de la máscara de convolución en píxeles, y  $-\frac{m}{2} < k, l < \frac{m}{2}$ .

Se realizaron filtrados con máscaras desde 3x3 hasta 25x25 píxeles. El filtrado temporal se llevó a cabo de manera similar, en secuencias de 3 a 5 frames, con el máximo peso en el frame central. Se pueden consultar los detalles sobre el cálculo de la SNR y la distorsión introducida por los filtrados en la referencia citada.<sup>17</sup>

Para obtener el espectro espacial, se aplicó una transformada rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform*, FFT) bidimensional, reordenando los cuadrantes para que la frecuencia 0 esté situada en el centro de la imagen espectral.

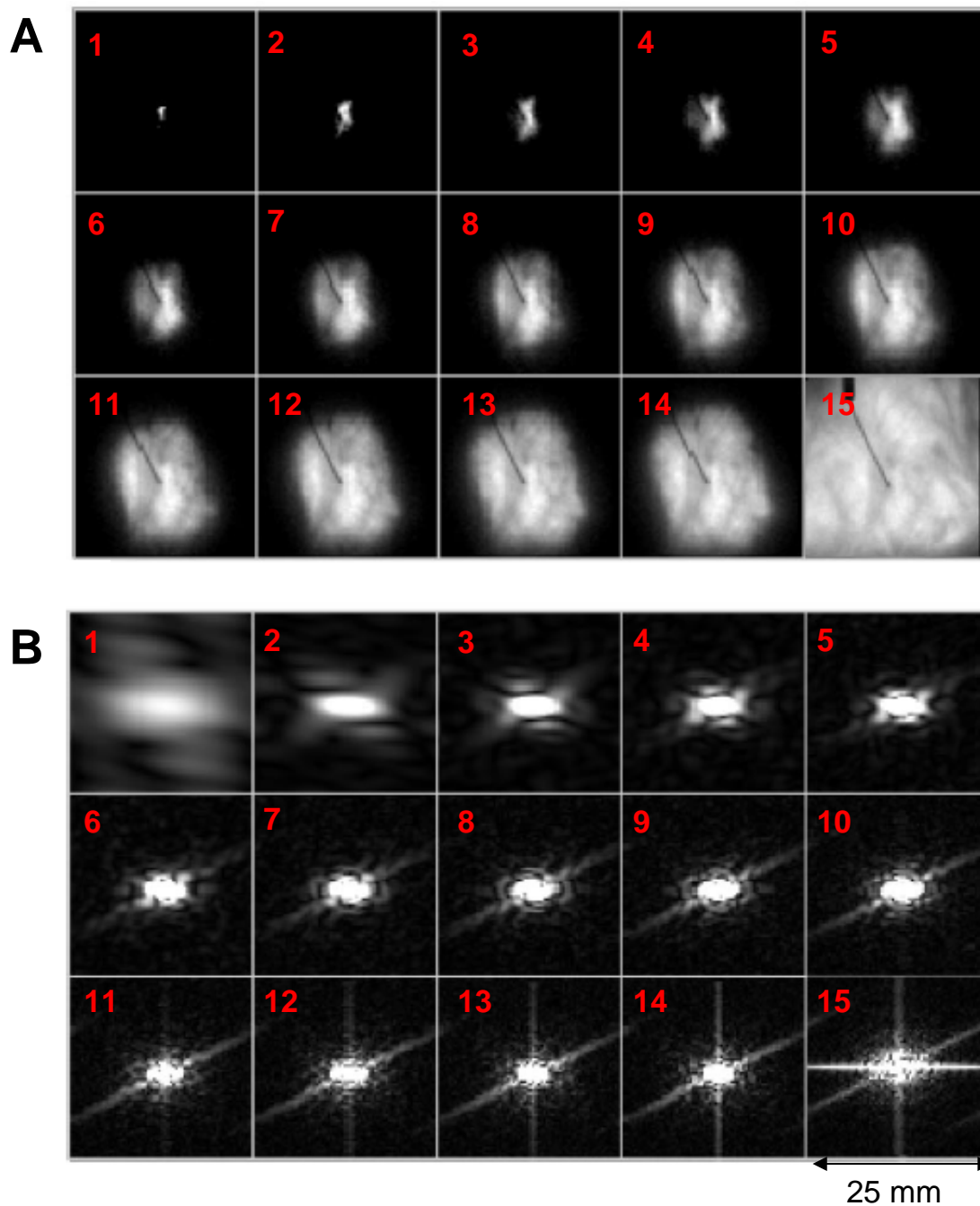
Para obtener el espectro temporal, se calculó el espectro individual de la evolución temporal de cada píxel a lo largo de la película. Para obtener un espectro temporal global de la película, se promediaron los espectros temporales de cada píxel.

Para obtener una película con alta SNR que pudiera servir como referencia para la comparación de los métodos de filtrado, se realizó un registro estimulando con electrodo unipolar en el centro de la región grabada. Se promediaron las películas de 124 potenciales de acción ópticos con las mismas características, con lo que se consiguió aumentar la SNR desde 12,6 hasta 125,8.

La **Figura 12A** muestra 15 frames de la película de activación resultante, donde las zonas oscuras corresponden a regiones de tejido que aún no han sido despolarizadas, mientras que las zonas claras corresponden a tejido despolarizado. Se puede ver como el frente de activación tiene forma elíptica, y además se observa la sombra del electrodo unipolar, que servirá para mostrar características interesantes del espectro espacial. También se pueden ver características físicas del tejido, como vasos coronarios o tejido graso, más visibles a medida que se va despolarizando el tejido.

El espectro espacial de cada frame se muestra en la **Figura 12B**. Las frecuencias espaciales bajas, se corresponden con las características más grandes de la imagen, y están localizadas en el centro del espectro espacial, mientras que las altas frecuencias espaciales se localizan en la periferia. Los espectros espaciales de todas las imágenes tienen un núcleo brillante (más energía en las frecuencias espaciales bajas), rodeado de una nube mucho más difusa de píxeles grises (mucho menos energía en las frecuencias espaciales altas).





**Figura 12. A:** Frames de una película de activación que muestra la propagación del frente de despolarización en la región filmada. Las zonas oscuras corresponden a tejido aún no despolarizado, mientras que las zonas brillantes corresponden a tejido ya despolarizado. Se utilizó un electrodo unipolar pinchado en el centro de la región filmada para la generación de los frentes estimulados. **B:** Espectros espaciales de cada uno de los frames mostrados en A. La frecuencia espacial 0 está situada en el centro de la imagen espectral. Adaptado de la referencia <sup>17</sup>.

A medida que avanza el frente de despolarización, el contenido de alta frecuencia de las imágenes disminuye (se observa muy claramente en los espectros de los primeros 5 frames). Además, los espectros espaciales de los frames comienzan a mostrar primeramente una línea diagonal, (comienza a ser bastante visible en el frame 6) y ya en los últimos frames, aparecen

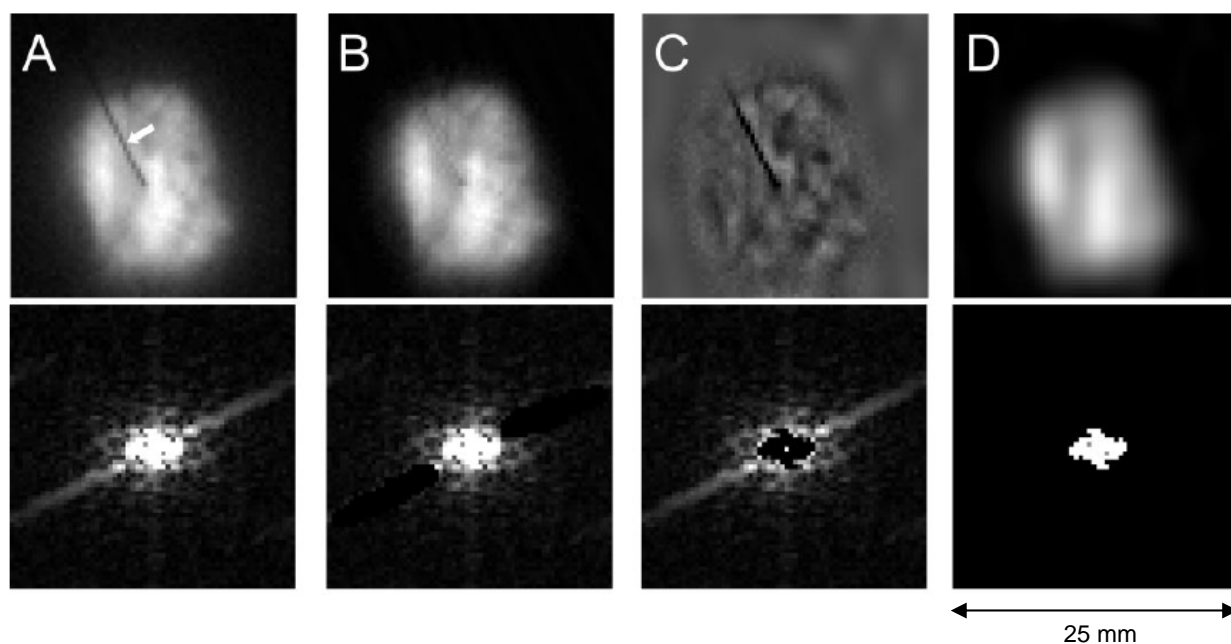
líneas verticales y horizontales en el espectro espacial. Dichas líneas verticales y horizontales, son debidas al efecto del frente de onda alcanzando los bordes verticales (frame 10 aproximadamente), y, horizontales (frame 15), respectivamente de la imagen.

Para evaluar el origen de las líneas diagonales del espectro, y determinar el origen de cada grupo de componentes espectrales espaciales, se fueron eliminando dichas componentes en el espectro, y evaluando su efecto en la imagen realizando la FFT bidimensional inversa. La **Figura 13A** en su parte superior muestra un frame de la película de activación, en el que ya se ha despolarizado aproximadamente la mitad de la región filmada. La parte de abajo muestra su espectro espacial.

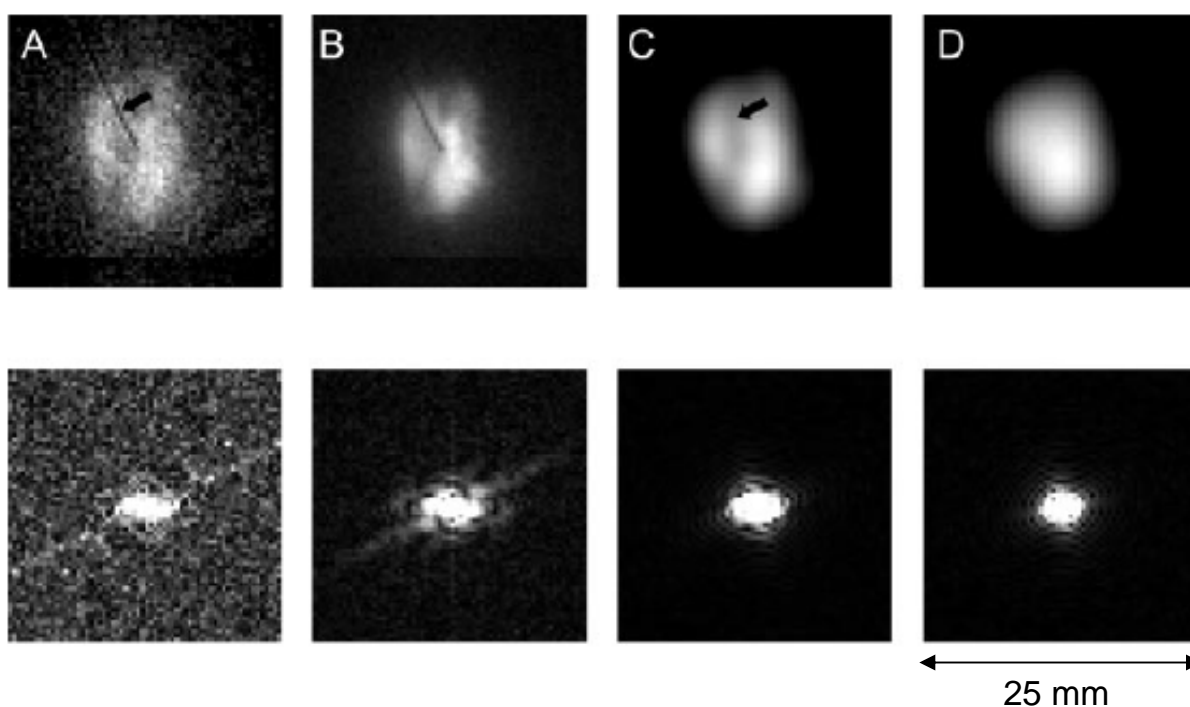
Este espectro tiene principalmente 3 partes: un núcleo denso en el centro, una nube más difusa de píxeles grises, y una banda diagonal. La banda diagonal es debida la sombra del electrodo de estimulación, lo que se muestra en la **Figura 13B**. En ella, en su parte inferior se muestra el espectro en el que se han eliminado la banda diagonal, y en la superior la FFT bidimensional inversa de dicho espectro, que ofrece una imagen en la que la sombra del electrodo de estimulación ya no es apenas visible.

Si lo que eliminamos en el espectro es la zona brillante central (**Figura 13C abajo**), su efecto en la imagen se muestra en la **Figura 13C arriba**. Desaparece el frente de activación (baja frecuencia espacial), quedando sólo pequeños elementos de alta frecuencia. Por último, si se elimina la nube difusa de píxeles grises en el espectro (componentes de alta frecuencia espacial, **Figura 13D abajo**), su efecto en la imagen es una representación nítida del frente de despolarización, en la que desaparecen los pequeños elementos de alta frecuencia (pequeñas estructuras anatómicas, texturas del tejido etc.). Esto nos muestra que las componentes de frecuencia espacial realmente importantes, debidas al frente de despolarización, se concentran en las bajas frecuencias espaciales.

También se evaluó el efecto de filtrados espaciales sobre la película en crudo, con máscaras de 7x7 y de 13x13 píxeles con los pesos descritos anteriormente, en la mejora de SNR y la distorsión que producían al comparar con la película obtenida de promediar 124 potenciales de acción ópticos, que es la que se toma como referencia de calidad. El efecto de dichos filtrados se muestra en la **Figura 14**, donde la fila superior representa el frame 7 de la **Figura 12** en crudo (A), tras promediar 124 potenciales de acción (B), tras filtrado paso bajo con máscara de 7x7 (C), y tras un filtrado paso bajo más agresivo con máscara de 13x13 (D).

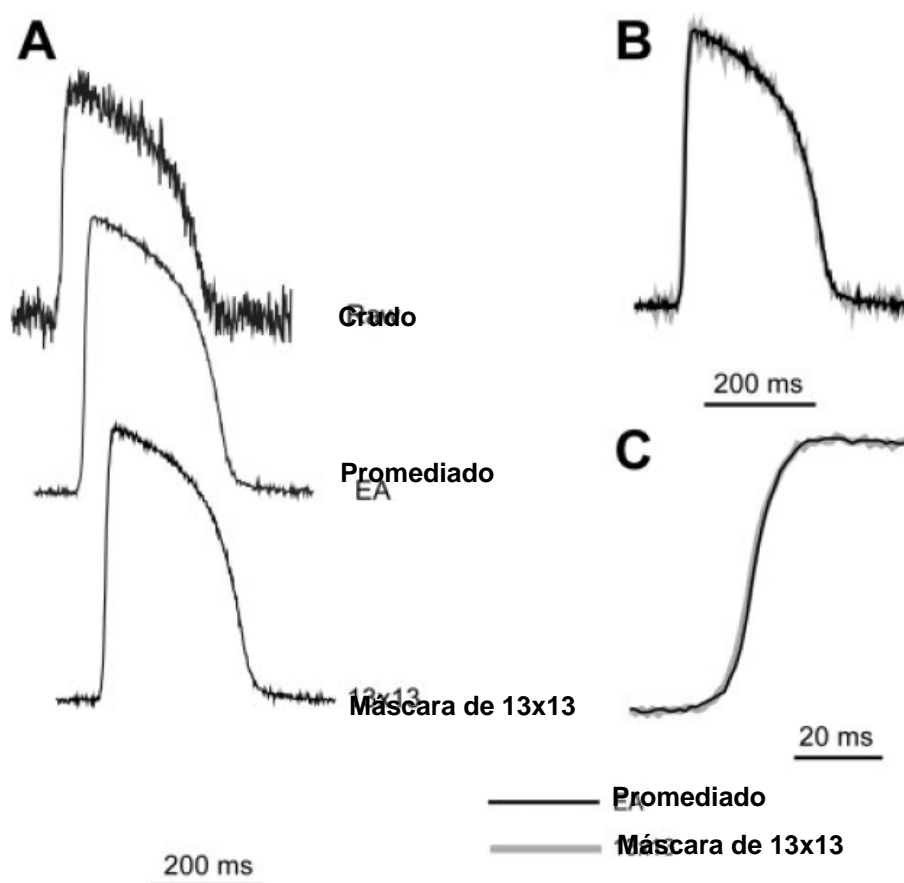


**Figura 13.** Eliminación selectiva de componentes espectrales, y su efecto sobre la imagen. La fila superior representa la imagen, y la inferior su espectro. **A:** Frame 9 de la Figura 12 y su espectro. **B:** Misma imagen, en la que se ha eliminado la banda diagonal, lo que tiene como resultado la desaparición de la sombra del electrodo de estimulación en la imagen. **C:** Se eliminan las componentes espectrales de baja frecuencia espacial, lo que tiene como resultado la desaparición del frente de despolarización. **D:** Se eliminan las componentes espectrales de alta frecuencia espacial, lo que produce la desaparición de los pequeños elementos anatómicos y texturas de la imagen, mostrando de manera muy clara el frente de activación. Adaptado de la referencia <sup>17</sup>.



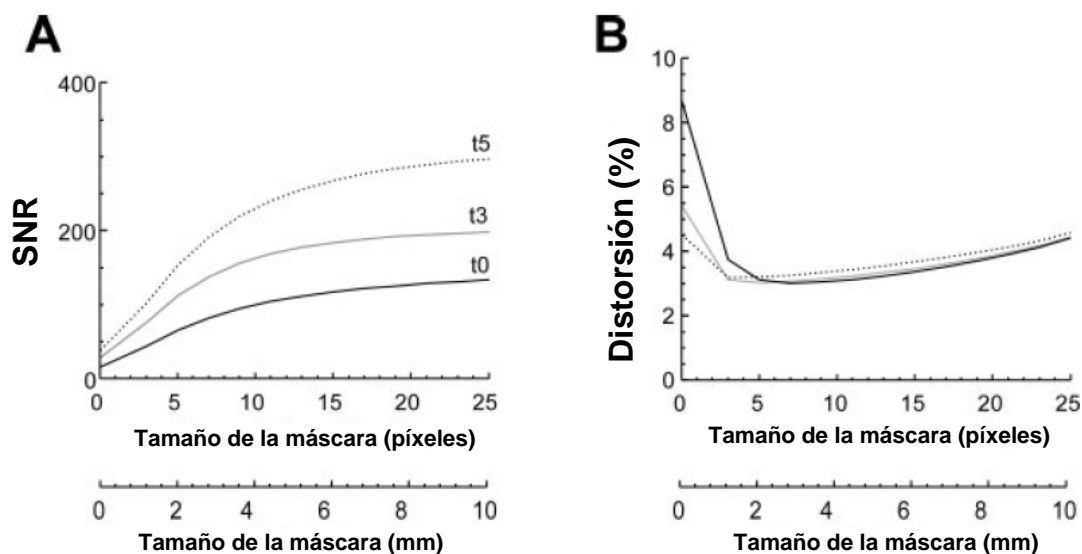
**Figura 14.** Efecto de los filtrados espaciales. La fila superior muestra el frame 7 de la Figura 16, y la fila superior su espectro espacial, en distintas situaciones. **A:** en crudo. **B:** Tras promediado de 124 potenciales de acción ópticos. **C:** Tras filtrado con máscara de 7x7 píxeles. **D:** Tras filtrado con máscara de 13x13 píxeles. Adaptado de la referencia <sup>17</sup>.

La **Figura 15** muestra el efecto de los filtrados espaciales sobre los potenciales de acción ópticos en el dominio del tiempo, donde fundamentalmente se observa que aunque con filtrado espacial no se consiguen mejoras de la SNR tan importantes como con el promediado, no existe apenas distorsión temporal, por lo que el cálculo de los instantes de activación será correcto.



**Figura 15.** Efecto de los filtrados espaciales sobre los potenciales de acción ópticos en el dominio del tiempo. **A:** Potenciales de acción ópticos en crudo, tras promediar 124 (referencia), y tras filtrado espacial con máscara de 13x13 píxeles desde los datos en crudo. **B:** Potenciales de acción ópticos tras promediado (negro), y tras filtrado espacial de 13x13 píxeles (gris). **C:** Fase 0 del potencial de acción óptico tras promediado (negro) y tras filtrado espacial de 13x13 píxeles (gris). Se observa como el filtrado espacial no introduce distorsión temporal. Adaptado de la referencia <sup>17</sup>.

La **Figura 16** muestra las curvas que relacionan la SNR y la distorsión obtenidas por efecto del filtrado espacial, para distintos tamaños de máscara. En la **Figura 16B** se muestran las mismas curvas pero tras añadir filtrado temporal, con distintos tamaños de núcleo (0, 3 y 5 frames).



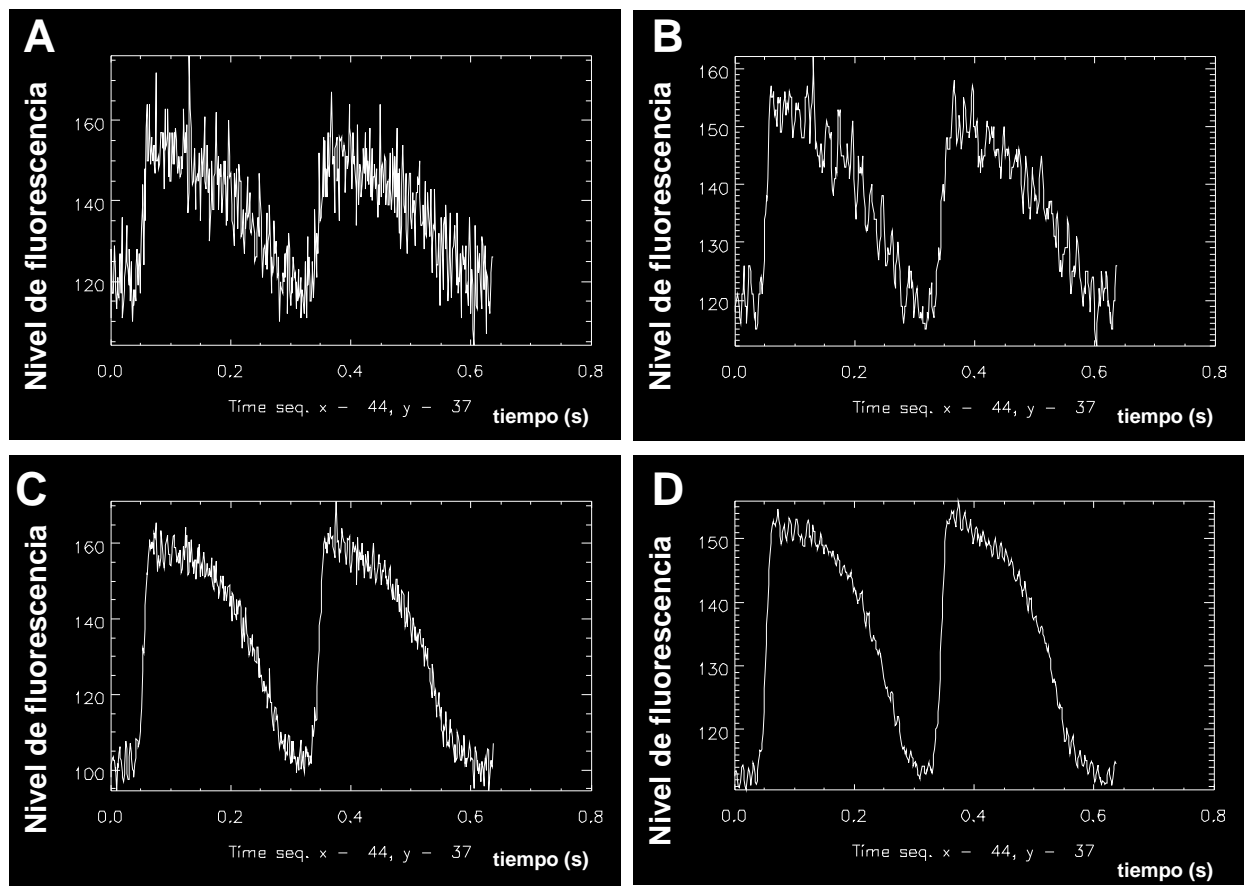
**Figura 16.** Efecto combinado del filtrado espacial y temporal para distintos tamaños de la máscara espacial, y distintos tamaños de núcleo del filtrado temporal (t0 sin filtrado temporal, t3 con núcleo de 3 frames, t5 con núcleo de 5 frames). **A:** sobre la relación señal a ruido. **B:** Sobre la distorsión introducida. Adaptado de la referencia <sup>17</sup>.

Finalmente, a modo de resumen, la **tabla 1** muestra los resultados de SNR y distorsión para la señal en crudo, tras promediado de 124 potenciales de acción ópticos, tras ser filtrada con una máscara espacial de 7x7 píxeles, con máscara de 13x13 píxeles, y con una combinación de máscara de 7x7 píxeles y filtrado temporal con núcleo de 5 frames. Se toma como referencia de distorsión nula la imagen obtenida por promediado de 124 potenciales de acción ópticos.

Película	SNR	Distorsión (%)
En crudo	12,6	7,3
Promediada de 124 potenciales de acción ópticos	125,8	0
Filtrado espacial 7x7 píxeles	71,6	2,9
Filtrado espacial 13x13 píxeles	100,7	3,4
Filtrado espacial 7x7 + filtrado temporal con núcleo de 5 frames	144,3	3,1

**Tabla 1.** Relación señal a ruido y distorsión introducida por distintos tipos de filtrado. Se toma como referencia de distorsión 0 la obtenida en la película promediada de 124 potenciales de acción ópticos. Adaptado de la referencia <sup>17</sup>.

De acuerdo a estos resultados, se demuestra que la combinación de filtrados espaciales y temporales puede mejorar significativamente la SNR de los registros de CO, introduciendo una distorsión muy pequeña. Es por ello que en nuestro laboratorio utilizamos esta opción. La **Figura 17** muestra ejemplos de un potencial de acción adquirido en nuestro laboratorio en crudo (A), tras filtrado espacial de 5x5 píxeles (B), tras filtrado temporal con núcleo 3 frames (C), y una combinación de ambas (D), pudiendo apreciarse a simple vista la mejoría obtenida en la SNR.



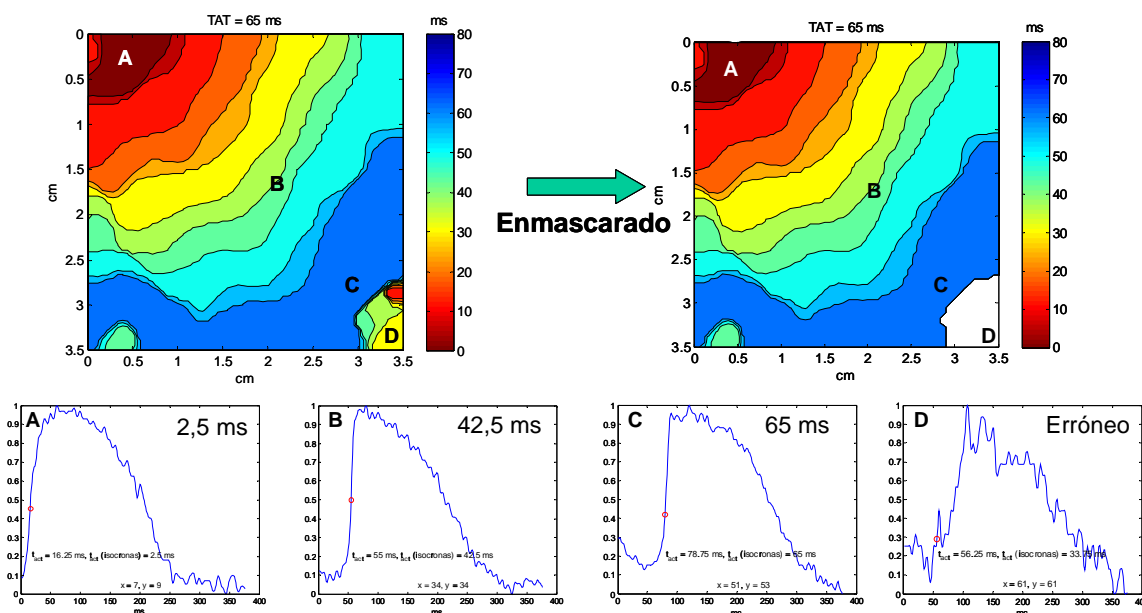
**Figura 17.** Efecto del filtrado espacial y temporal en nuestro laboratorio. **A:** Señal correspondiente a dos potenciales de acción ópticos en crudo. **B:** Tras filtrado temporal con núcleo de 3 frames. **C:** Tras filtrado espacial con máscara de 5x5 píxeles. **D:** Tras la combinación de filtrado temporal de 3 frames, y espacial de 5x5 píxeles. Se observa una clara mejoría en la SNR.

### 1.3.2 Enmascarado

A pesar de los buenos resultados en cuanto a mejora de la SNR que se pueden obtener mediante los filtrados espacio-temporales descritos, algunas regiones de la imagen pueden continuar con una baja SNR tras estos filtrados. Las causas que pueden dar lugar a esta situación son:

- Poco nivel de iluminación en esa región. Muchas veces es difícil conseguir una iluminación uniforme sobre toda la región a estudiar, por ello en algunas regiones, el nivel de señal obtenido puede ser mucho menor que en otras (ver esquinas inferiores del frame 6 en la **Figura 4**).
- Artefacto de movimiento demasiado pronunciado que provoca que el algoritmo de detección de los instantes de activación o repolarización obtenga valores incorrectos en esas regiones.
- Elementos físicos como suturas, desgarros, pericarditis, vasos, etc. que hacen que la señal registrada en esa zona sea de muy baja calidad.
- Zonas a las que no llega el tinte sensible a voltaje.

Es muy conveniente enmascarar estas zonas para que no sean tenidas en cuenta por los algoritmos utilizados para analizar las películas y extraer parámetros de interés, ya que podrían hacer llegar a conclusiones incorrectas al investigador. Un ejemplo de enmascarado sobre un mapa de isócronas de activación se presenta en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Ejemplo de mapa de isócronas de activación antes y después de enmascarar zonas de baja SNR y potenciales de acción ópticos en algunos puntos de la imagen.

## 1.4 Técnicas de análisis asociadas al CO que se han trasladado a la clínica

### 1.4.1 Mapas de activación, repolarización, refractariedad y longitud de onda

Este tipo de mapas son de gran utilidad para evaluar el sustrato proarritmico. Su obtención se explica con mucho detalle en el suplemento en línea del **Capítulo 3**, por lo que no se replica en este apartado.

### 1.4.2 Análisis espectral y frecuencias dominantes

Este tipo de análisis se usará en los **Capítulos 4 y 5**. En un contexto de fibrilación, el análisis espectral se utiliza generalmente para localizar las áreas con las frecuencias de activación más altas (longitudes de ciclo más cortas). Tales áreas se supone que deben albergar fuentes de alta frecuencia (focales o reentrantes) y por lo tanto, se supone a menudo que son los directores del proceso fibrilatorio auricular o ventricular.

Hace unos 15 años, Berenfeld et al.<sup>18</sup> aplicaron el análisis espectral a electrogramas auriculares. Se pueden encontrar algunos buenos tutoriales para entender cómo funciona y para

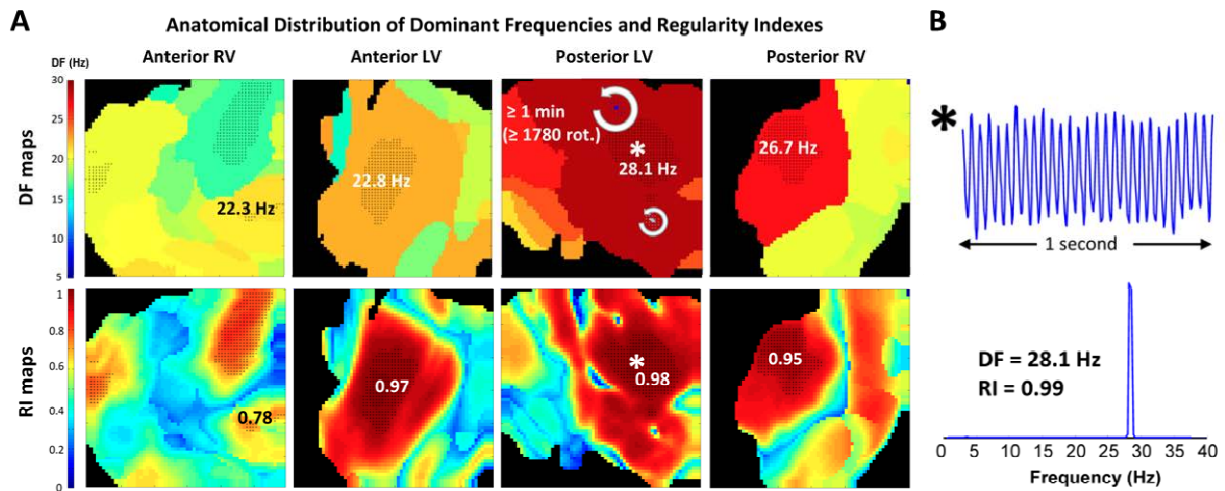
qué sirve el análisis espectral en los electrogramas de FA.<sup>19-21</sup> Brevemente, el espectro de una señal fibrilatoria representa la distribución de la energía / potencia de la señal en el dominio de la frecuencia. La frecuencia a la que se encuentra el pico más alto del espectro se llama frecuencia dominante (FD) y a menudo se interpreta como un sustituto de la frecuencia de activación promedio (inversa del ciclo de activación promedio) en la región donde la señal ha sido adquirida. El análisis espectral permite a los investigadores poder realizar un análisis automatizado de los electrogramas y es especialmente útil cuando es difícil medir la tasa de activación de la señal en el dominio del tiempo.

Además, el espectro se utiliza a menudo para cuantificar la complejidad aperiódica de las señales utilizando el índice de regularidad (IR).<sup>22</sup> Este índice se basa en el hecho de que la señal más pura en el dominio de la frecuencia es una senoide con duración infinita, que debe tener una sola línea espectral (delta de Dirac, sin anchura espectral). Puesto que las señales analizadas no tienen una duración infinita, incluso el espectro calculado a partir de una senoide tendrá cierta anchura debido al "enventanado temporal" producido por su longitud limitada. Por eso, se considera un cierto margen de frecuencias alrededor de la frecuencia del pico (FD) cuando se calcula el IR. De esta manera, el IR se define generalmente como el cociente entre la potencia en un cierto intervalo alrededor de la FD (para tener en cuenta la "anchura" de las líneas espectrales debido al enventanado temporal) y la potencia total en el espectro. Las regiones con alta periodicidad presentarían, en principio, un solo pico estrecho, lo que daría como resultado valores de IR cercanos a 1. En la **Figura 19** se muestran ejemplos de mapas de FD e IR de la actividad en los ventrículos de un corazón porcino durante FV acelerada farmacológicamente. Dicha actividad fue registrada mediante CO epicárdico. Se trata de un buen ejemplo para ilustrar el concepto de zonas de alta tasa de activación y periodicidad (alta FD e IR) que potencialmente dirigen el proceso fibrilatorio. Estas áreas están rodeados de otras que no son capaces de activarse a esas frecuencias tan altas, produciendo conducción fibrilatoria (FDs e IRs más bajos).

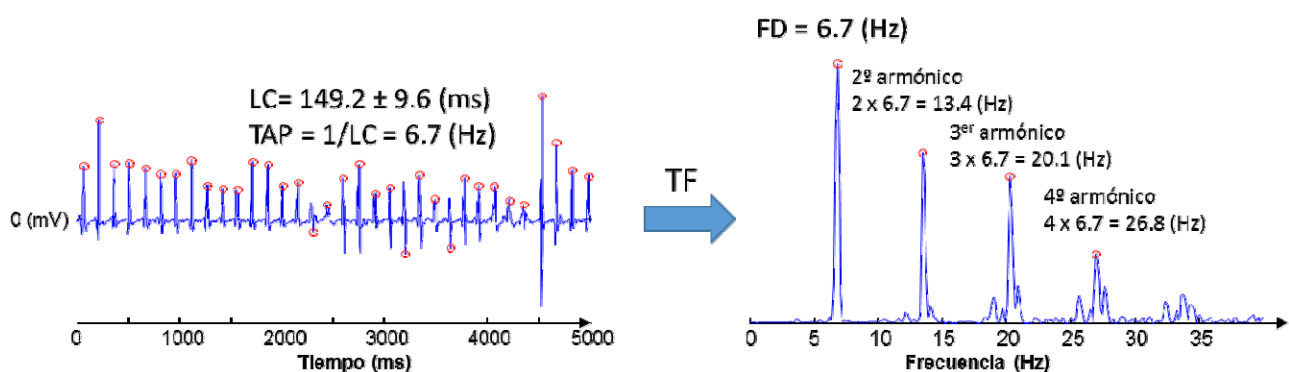
Pero las señales puramente periódicas en el tiempo, no tienen por qué tener un espectro con un solo pico. En realidad tienen un espectro formado exclusivamente por "líneas espectrales" equiespaciadas en frecuencia, situadas en la frecuencia fundamental (inversa del periodo en el tiempo) y sus armónicos (frecuencias múltiplo de la fundamental). Esto ha sido tenido en cuenta por algunos trabajos que analizaron electrogramas intracavitarios auriculares y que han utilizado otro índice (índice de organización, IO) que tiene en cuenta los armónicos sucesivos de la frecuencia fundamental.<sup>23</sup> Esto no es necesario cuando se trabaja con los potenciales de acción ópticos ya que no se encuentran generalmente armónicos importantes en sus espectros.<sup>24</sup> Sin embargo, este índice sí se ha utilizado para analizar los electrogramas cardiacos, porque en este caso sí pueden encontrarse armónicos considerablemente altos en sus espectros como se muestra en la **Figura 20**. Es muy importante que no se seleccione un pico armónico como la frecuencia dominante para estimar la tasa de activación, ya que esta elección sesgará de manera muy importante los resultados del análisis espectral, lo que llevaría a conclusiones erróneas



acerca de las tasas de activación y la identificación de las áreas que dirigen el proceso de fibrilación. En este sentido puede ser de gran interés leer el trabajo de Barquero et al.<sup>25</sup>



**Figura 19. A.** Ejemplo de la distribución espacial de frecuencias y la organización espectral en un corazón con dos rotors principales. Dos rotors epicárdicos sostenidos en el tiempo (puntos azules claros y oscuros) situados en el VI posterior, mantuvieron el dominio más rápido de todos los ventrículos. No se encontraron más rotors persistentes visibles epicárdicamente en este corazón. Las zonas anatómicas adyacentes al VI posterior alojaron los dominios con la segunda y tercera FDs más altas. El VD anterior, que no estaba anatómicamente relacionado con el dominio más rápido, exhibió las FDs más bajas. Es de destacar que en los mapas de IR, se pueden ver áreas mal organizadas (en azul) al lado de los dominios más organizadas (en rojo), lo que sugiere rotura de ondas y conducción fibrilatoria periférica lejos de los rotors principales. Las áreas sombreadas en los mapas de FD e IR corresponden a los píxeles que muestran la más alta periodicidad (10% superior de los valores de IR). **B.** Potenciales de acción ópticos y su espectro en el píxel marcado con el asterisco blanco en A. Al tratarse de una región con muy alta organización y periodicidad, el espectro muestra una única componente. Adaptado de Quintanilla et al.<sup>26</sup>



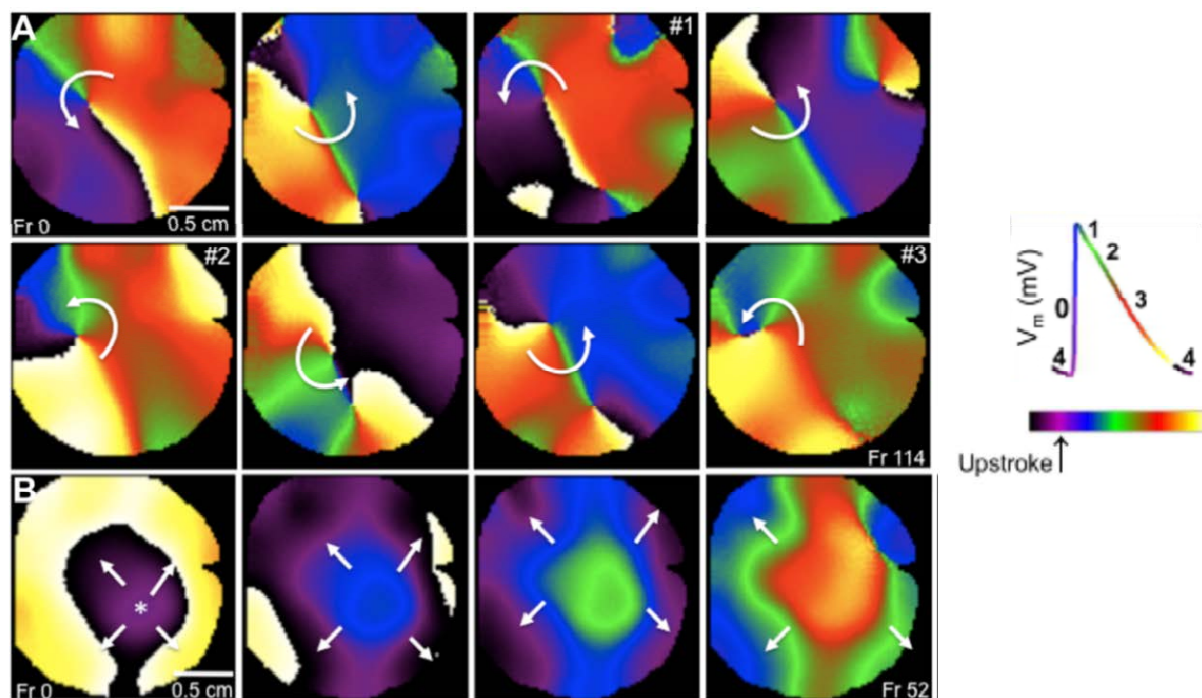
**Figura 20.** Electrograma bipolar obtenido de la orejuela auricular izquierda de un paciente con FA. Los círculos rojos muestran los instantes de activación. LC: longitud de de ciclo, TAP: tasa de activación promedio, TF: Transformada de Fourier, FD: Frecuencia dominante. El pico fundamental del espectro se encuentra a una frecuencia (FD) que coincide con la TAP. Los picos situados en las frecuencias múltiplo de la FD se llaman armónicos. Un armónico no debe seleccionarse como FD, incluso aunque sea más alto que la frecuencia fundamental, ya que esto daría lugar a conclusiones erróneas.

### 1.4.3 Cartografiado de fases

El cartografiado de fases es un enfoque que permite la visualización de los patrones espacio-temporales durante la fibrilación cardíaca mediante la determinación de la fase local del ciclo de activación/recuperación en cada instante. Esto hace posible la detección de las singularidades de fase o puntos singulares, que son los puntos donde convergen simultáneamente todas las fases posibles del potencial de acción, como ocurre por ejemplo en los puntos alrededor de los cuales pivotan los rotores. El cartografiado de fases se puede utilizar con señales eléctricas,<sup>27</sup> aunque el CO (el “patrón oro”) proporciona una resolución y precisión mucho mayor en el espacio y el tiempo para el seguimiento de la formación y mantenimiento de rotores.<sup>28</sup> Un detallado tutorial sobre la cartografía de fases durante la fibrilación cardíaca se puede encontrar en Umapathy et al.<sup>27</sup>

Hay diferentes opciones para obtener esta fase instantánea. Algunas se basan en la comparación de la señal con una versión desplazada de la misma un cierto tiempo  $t_0$ . Sin embargo, estos enfoques para calcular la fase requieren una elección un tanto arbitraria de  $t_0$ . En el **Capítulo 4**, nosotros utilizamos otro enfoque basado en el uso de la Transformada de Hilbert (TH).<sup>29</sup> En términos simples, la TH es otra manera de generar una señal desplazada (o desfasada) de la señal original de manera automática y que no requiere elección ninguna. Usando la señal original y la desfasada mediante TH, se puede calcular la fase instantánea. La **Figura 21** muestra varias imágenes de películas de fase obtenidas mediante TH de registros de CO auriculares donde se puede ver un rotor (A) y una activación focal (B). En la leyenda de dicha figura se muestra la correspondencia entre los colores y las diferentes fases del potencial de acción, pero en realidad los valores que devuelve el algoritmo son desfases dentro del intervalo  $[-\pi, \pi]$ .

Entrando en más detalles matemáticos, la TH puede ser utilizada para transformar una señal real  $x(t)$  en una señal compleja  $a(t)$  mediante la eliminación de la frecuencias negativas de la señal. Para ello, la TH introduce un desplazamiento de fase de  $-90$  grados a las frecuencias positivas y de  $+90$  grados a las negativas de  $x(t)$ , obteniendo  $x_H(t)$ . Cuando  $x_H(t)$  se añade como parte imaginaria con la señal original  $x(t)$  como parte real, las frecuencias negativas se cancelan. Una vez hecho esto, tenemos la señal “analítica” en la forma cartesiana  $a(t) = x(t) + jx_H(t)$  (siendo  $j$  el número imaginario). Por supuesto, dicha señal compleja se puede poner en forma exponencial  $a(t) = \rho(t)e^{j\theta(t)}$ , donde  $\theta(t)$  que es el parámetro que buscamos, se puede calcular fácilmente mediante  $\theta(t) = \arctg[x_H(t) / x(t)]$ .



**Figure 21.** Diferentes patrones de activación identificados después de generar películas de fase con datos de CO de aurícula izquierda en corazón de oveja. **A.** Instantáneas secuenciales de la película de fases mostrando el giro de un rotor alrededor de un punto singular/singularidad de fase (punto donde convergen todas las fases). **B.** patrón de activación focal o afloramiento. La onda aparece en el centro de la región filmada y se propaga hacia el exterior. Derecha: leyenda para las diferentes fases del potencial de acción como un código de colores (de Filgueiras-Rama et al.<sup>30</sup>)

## 1.5 Variantes y tendencias en CO

### 1.5.1 Sistemas ratiométricos duales para medida del potencial transmembrana

En algunos trabajos se han realizado medidas ratiométricas con la fluorescencia recogida a dos longitudes de onda diferentes, utilizando tintes como los expuestos apartados anteriores.<sup>31</sup> Este tipo de montaje tiene varias ventajas, a costa eso sí, de una instrumentación más compleja. Se fundamentan en el desplazamiento espectral mostrado en la **Figura 6**, de tal forma que se mide la fluorescencia en los dos extremos opuestos de la banda espectral, y se calcula su ratio. Como la señal tiene el signo contrario en cada uno de los dos extremos, la sensibilidad del ratio es aproximadamente el doble que la obtenida en las medidas habituales teniendo en cuenta sólo uno de los dos extremos del espectro. Otra ventaja es que el ratio es independiente del nivel de ligado de las moléculas del tinte a la membrana, que puede ser diferente en distintas zonas de la preparación. Además, la medida ratiométrica compensa el fotoblanqueamiento, ya que tiene un valor similar en los dos extremos de la banda espectral.<sup>7</sup>

### 1.5.2 Cartografiado óptico de los transitorios de calcio intracelular

Los ciclos de calcio, en concreto el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, son de gran importancia para el acoplamiento de estímulo y contracción. Cuando el potencial de acción llega a los -40 mV se

abren los canales de calcio, de tal forma que el  $\text{Ca}^{2+}$  entra en la célula, provocando una liberación masiva de calcio desde el retículo sarcoplasmático que inicia el mecanismo de contracción celular. En condiciones patológicas, como la insuficiencia cardíaca, existe una desregularización de los transitorios de calcio, contribuyendo a una disfunción de la contractilidad y arritmogénesis.<sup>32</sup>

A la hora de elegir un tinte de calcio no sólo hay que tener en cuenta las propiedades espectrales del mismo, sino también su afinidad con el  $\text{Ca}^{2+}$ . Los tintes con una afinidad alta son los más utilizados, ya que existe una gran variedad de propiedades espectrales, pero tienen el inconveniente de que pueden prolongar artificialmente los transitorios de calcio y confundir la interpretación<sup>12</sup>. En cambio, los tintes de baja afinidad permiten una medición más precisa de la dinámica del calcio pero tienen otros inconvenientes ya que las relaciones señal a ruido obtenidas son algo peores<sup>33</sup>. El Fura-2 y el Indo-1 fueron los primeros tintes de alta afinidad utilizados.<sup>7</sup> Dentro del grupo de tintes de afinidad alta también se encuentran el Fluo-3 (ex. 506 nm / em. 526 nm), Fluo-4 (ex. 494 nm / em. 516 nm) y Rhod-2 (ex. 557 nm / em. 581 nm), los cuales tienen la ventaja de que la luz de excitación necesaria es de longitudes de onda visibles, siendo la atenuación de la luz de excitación/emisión menor.<sup>34</sup>

Recientemente se ha desarrollado el tinte de baja afinidad Fura-4F (ex. 340-380 / em. 510 nm), del cual se ha demostrado que genera una señal continua estable en un periodo de 5 a 10 minutos, sin provocar fototoxicidad o fotoblanqueamiento.<sup>35</sup>

### **1.5.3 CO simultáneo de tensión transmembrana y transitorios de calcio con 2 sensores**

Como las longitudes de onda a las que se encuentran los picos de excitación y emisión de los indicadores fluorescentes varía desde el ultravioleta hasta el infrarrojo cercano, es posible medir más de un parámetro en el mismo corazón, midiendo la intensidad de fluorescencia a longitudes de onda separadas. Para poder hacer esto, es necesario seleccionar tintes con los que la emisión de luz se realice a longitudes de onda diferentes (es decir, tintes con un solapamiento mínimo del espectro de emisión). Es el caso por ejemplo, del Di-4-ANEPPS para potencial transmembrana, e indo-1 para los transitorios de calcio.<sup>36-38</sup> Otra combinación bastante utilizada es RH237 para voltaje y Rhod2 para calcio.<sup>39</sup> El principal inconveniente de estos sistemas es que requieren el uso de dos detectores (por ejemplo, 2 cámaras CCD) que son el elemento más caro de un sistema de CO.

### **1.5.4 CO simultáneo de tensión transmembrana y transitorios de calcio con 1 sólo sensor**

El alcance de los sistemas de CO con una única cámara ha estado limitado a la captación de registros uniparamétricos (potencial de membrana:  $V_m$  o transitorios de calcio:  $\text{Ca}_i\text{T}$ ). Por otro lado, como hemos visto, desde hace un tiempo se han utilizado sistemas de CO

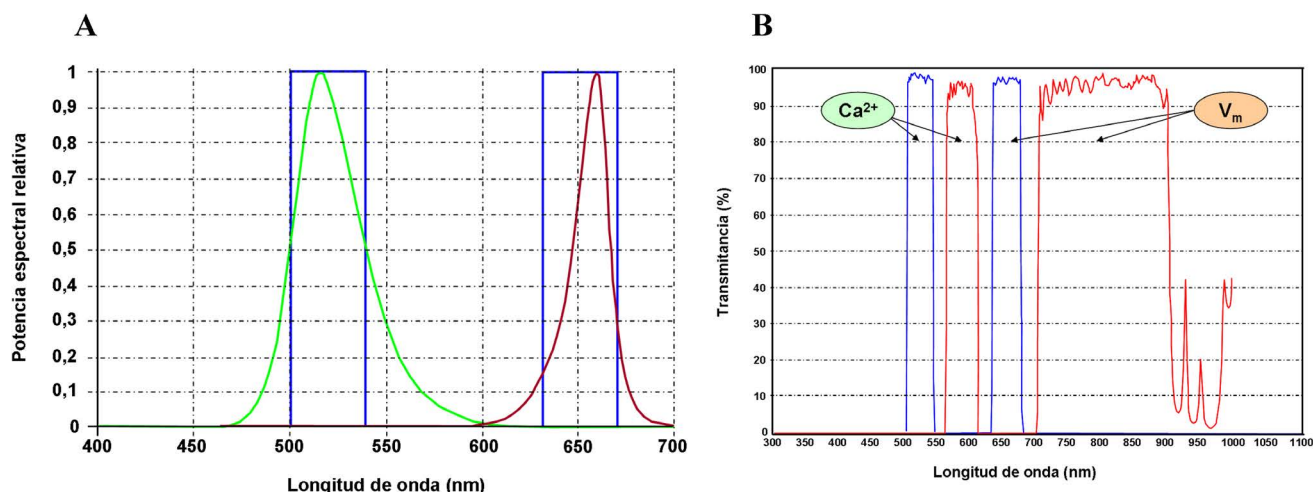
que permiten el registro simultáneo de 2 parámetros electrofisiológicos simultáneos (típicamente  $V_m$  y  $Ca_iT$ ).<sup>39</sup> Sin embargo, su complejidad técnica y los altos costes asociados (dos cámaras muy caras, sistemas ópticos auxiliares complejos con espejos dicróicos, alineamiento y sincronización de alta precisión a priori entre las cámaras, etc.), han impedido la generalización de su uso como una herramienta de investigación estándar hasta el momento.<sup>14</sup>

Recientemente las limitaciones de los sistemas de CO con una sola cámara se han visto solventadas gracias a los avances obtenidos en las tecnologías de iluminación y de adquisición,<sup>14</sup> así como en los tintes fotosensibles.<sup>10</sup> Las tasas de adquisición (imágenes por segundo) de las nuevas cámaras CCD y CMOS permiten obtener registros multiparamétricos con una alta resolución espacio-temporal utilizando un único detector. Para excitar los diferentes tintes fotosensibles utilizados (uno por cada parámetro a medir) a altas velocidades, es necesario utilizar fuentes de luz capaces de conmutar rápidamente (~1 ms) entre diferentes longitudes de onda, siendo los sistemas de iluminación LEDs los más apropiados para este fin.<sup>14</sup> Esto ha permitido, muy recientemente, obtener CO de múltiples parámetros electrofisiológicos simultáneos (por ejemplo  $V_m$  y  $Ca_iT$ ) con una única cámara.<sup>14</sup> Gracias a ello, ahora es posible realizar un estudio más exhaustivo de los mecanismos subyacentes en la generación del ritmo tanto en condiciones normales como fisiopatológicas, sin necesidad de usar dos cámaras.

Basándonos en un sistema de CO propuesto recientemente para corazón de roedor,<sup>14</sup> en un proyecto fin de máster dirigido por el doctorando (**Apéndice C**) se diseñó e implementó un sistema de CO cardíaco que permite el registro simultáneo de los  $V_m$  y  $Ca_iT$  en corazones grandes (cerdo, perro, oveja e incluso humano), utilizando una única cámara CCD y cuatro fuentes de iluminación LED (a dos longitudes de onda diferentes), además de los filtros ópticos y tintes fotosensibles apropiados. Si se desea, dicho sistema permite además la utilización de sangre en lugar de solución de perfusión transparente (Tyrode), ya que utiliza longitudes de onda en el infrarrojo cercano que son menos absorbidas por la hemoglobina que las de los sistemas clásicos de CO. La utilización de sangre posibilita modelos más realistas, con la ventaja adicional de limitar de manera muy importante la edematización del corazón bajo estudio, permitiendo experimentos de mayor duración con el corazón en condiciones óptimas.

La utilización de un tinte sensible a potencial transmembrana de nueva generación fue de gran importancia para nuestro sistema de CO de corazones de cerdo perfundidos con sangre, debido a que las longitudes de onda de emisión y excitación se encuentran en el infrarrojo cercano, permitiendo así el registro simultáneo de los potenciales transmembrana (di-4-ANBDQPQ) y transitorios de calcio (Rhod-2). Como muestra la **Figura 22A**, cuando excitamos con luz LED, alternando entre 532 nm (verde, para el Rhod-2) y 650 nm (rojo profundo, para el di-4-ANBDQPQ), los dos tintes emiten en rangos de longitudes de onda diferentes, por lo que acoplando un filtro óptico multibanda en la lente de la cámara CCD se pueden registrar las dos señales “simultáneamente” (**Figura 22B**). Esta combinación de tinte es ideal, puesto que el di-4-

ANBDQPQ tiene su punto isobéptico en el verde (longitud de onda de excitación a la cual un cambio producido en el potencial transmembrana no produce ni una disminución ni un aumento de la intensidad de emisión), y por lo tanto no se registra señal de voltaje cuando se ilumina con luz verde, que es la que se utiliza para excitar el Rhod-2.<sup>40</sup>

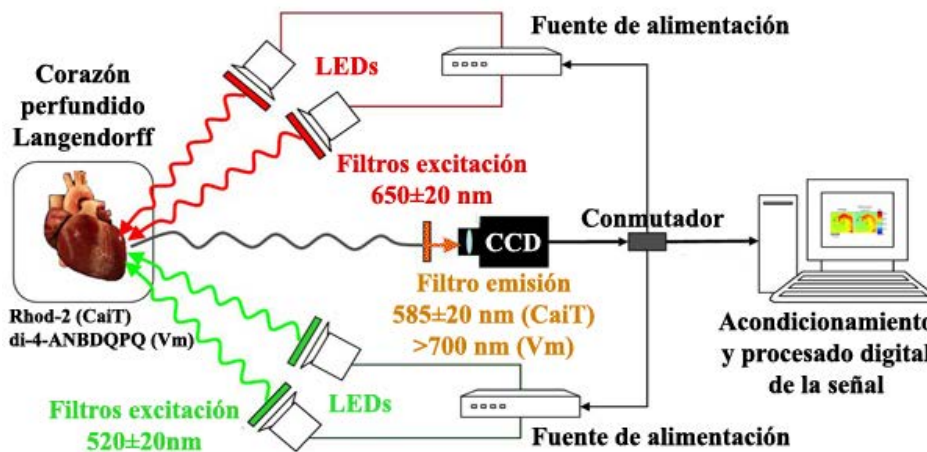


**Figura 22.** A: Potencia espectral relativa vs. Longitud de onda (nm) ( $T_c = 25^\circ\text{C}$ ) de los emisores LED verdes y los emisores LED rojos junto a sus respectivos filtros ópticos de excitación ideales (en azul). B: Espectro de transmisión (Transmitancia vs. Longitud de onda) de los filtros ópticos de excitación (azul) y del filtro óptico de emisión multibanda (rojo).

La **Figura 23** muestra el detalle del conmutador hecho a medida que se acopló a la cámara CCD para que la luz LED conmutara al ritmo de adquisición de la cámara, permitiendo una total sincronización del sistema. La **Figura 24** muestra un esquema del sistema completo que se implementó. Si el lector está interesado, puede encontrar más detalles en el proyecto fin de master dirigido por el doctorando, que se encuentra en el **Apéndice C**.<sup>13</sup>



**Figura 23.** Cámara DALSA conectada al conmutador de LED diseñado a medida. El interruptor permite elegir si se desea que los LED conmuten con la señal de *trigger* de la cámara, o con la señal de *valid frame*. A los conectores BNC se acoplaban sendos coaxiales que iban hacia la fuente de luz LED, para indicar cuando se debe producir la conmutación entre las dos longitudes de onda de excitación.



**Figura 24.** Esquema representativo de nuestro sistema de cartografiado óptico cardíaco multiparamétrico. Consta de 4 emisores LED (2 verdes y 2 rojos profundo) de 10 W cada uno. A cada par de emisores LED se les suministra la corriente mediante una fuente de alimentación específicamente diseñada para ello con capacidad de realimentación para ajuste automático de los niveles de corriente. El dispositivo de adquisición de imágenes utilizado es una cámara CCD de 12 bits que se sincroniza frame a frame con los LEDs mediante un conmutador a medida. Para la excitación del Rhod-2 se acoplan a los LEDs unos filtros de excitación en el rango  $520\pm 20$  nm y para la excitación del Di-4-ANBDQPP en el rango  $650\pm 20$  nm. Para el registro de la fluorescencia emitida por el corazón se acopla a la lente de la cámara un filtro multibanda ( $585\pm 20$  nm y  $>700$  nm).

### 1.5.5 Transiluminación

Como vimos anteriormente, la señal que contribuye a los potenciales de acción ópticos se estima que proviene de una fina capa de células en la superficie del corazón.<sup>7</sup> Esto tiene ventajas, pues los potenciales ópticos que se miden en la superficie, en principio, no aparecen contaminados por las señales que se originan en capas más profundas del miocardio. Sin embargo, los ventrículos pueden tener un grosor considerable, y si se desea estudiar la propagación eléctrica en el tejido cardíaco en 3 dimensiones, se debe extrapolar de los registros superficiales. Sin embargo, es posible obtener alguna información sobre lo que está ocurriendo en las capas de tejido más profundas de los ventrículos utilizando transiluminación, para lo que la fuente de luz y el detector, se sitúan en lados opuestos de la preparación.<sup>41</sup> Si la luz de excitación ilumina una preparación perfundida con un tinte sensible a voltaje, la fluorescencia que escapa de las capas profundas de la pared ventricular se pueden detectar, dando lugar a potenciales de acción identificables. Esta aproximación se ha utilizado para registrar actividad intramural en ventrículos gruesos. En cualquier caso, la interpretación precisa de estas señales es problemática debido a las complejas características ópticas del tejido.<sup>7</sup>

El mayor problema con la transiluminación es la disminución de la resolución espacial debido al *scattering*. Los *chromophores* excitados actúan como fuentes emisoras de fotones, fotones que viajan en todas las direcciones: lateralmente dentro del tejido, y también hacia el fotodetector. Esto hace que la imagen formada sea bastante borrosa. Pero se han desarrollado

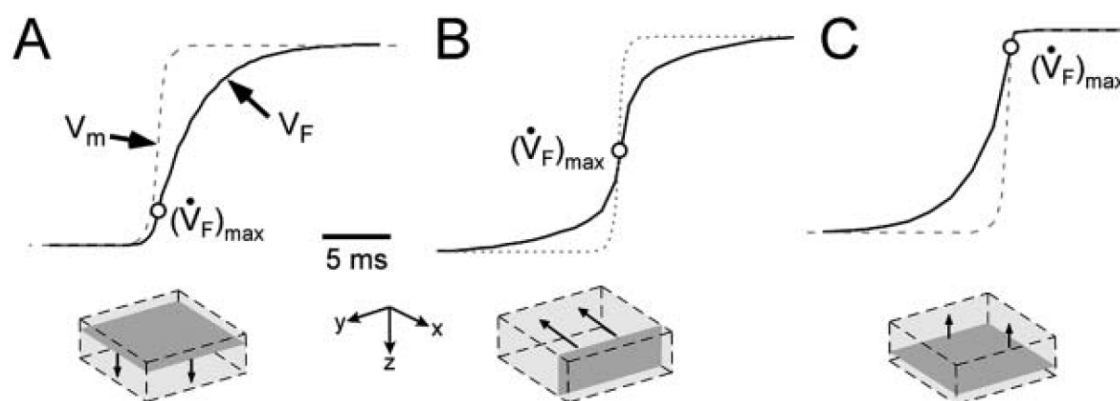


métodos para mejorar la resolución espacial en transiluminación, que permiten distinguir los fotones con *scattering*, de aquellos que no lo han sufrido, basándose en su ángulo de salida, o en el tiempo que han tardado en llegar al detector.<sup>7</sup>

### 1.5.6 Sistemas para la medida de potenciales de acción ópticos intramurales

Existen sistemas que permiten registros transmurales de los potenciales de acción ópticos.<sup>42-45</sup> Se utiliza una sonda construida con fibras ópticas para hacer llegar la luz de excitación y captar la fluorescencia a varias profundidades diferentes dentro de la pared ventricular. La excitación se realiza por medio de un láser. La fluorescencia emitida por el Di-4-ANEPPS desde cada posición del tejido se enfoca sobre detectores basados en fotodiodos para realizar medidas ratiométricas.

También tienen interés estudios recientes que parecen indicar que los potenciales de acción ópticos registrados en la superficie del miocardio pueden contener información valiosa sobre la dirección de los frentes de activación transmurales, y no sólo de los frentes de activación epicárdica. Por ello se han realizado investigaciones para intentar determinar cómo la morfología de los potenciales de acción registrados epicárdicamente, puede mostrar en qué dirección se propaga el frente de activación en el volumen de tejido que hay por debajo. Se ha descubierto que la morfología de la fase 0 del potencial de acción muestra una alta sensibilidad a la componente transmural de la velocidad del frente de activación, y se podría utilizar para predecir la orientación del mismo con respecto a la superficie.<sup>46-49</sup> Se muestra un ejemplo en la **Figura 25**.



**Figura 25.** Morfología de la fase 0 de los potenciales de acción ópticos en relación con la orientación del frente de activación transmural. La línea discontinua representa la fase 0 del potencial de acción medido con microelectrodos ( $V_m$ ).  $V_F$  es el potencial de acción óptico y  $(V_F)_{max}$  el instante de máxima pendiente del potencial de acción óptico. **A:** El frente de activación transmural se aleja perpendicularmente de la superficie epicárdica. **B:** La propagación del frente de activación es tangencial a la superficie epicárdica. **C:** El frente de activación transmural se acerca perpendicularmente a la superficie epicárdica. Adaptado de la referencia



Recientemente, el grupo de Fedorov ha utilizado tintes sensibles a voltaje de nueva generación y ha aprovechado la propiedad que poseen de contribuir al potencial de acción óptico con información de capas más profundas de tejido gracias a su emisión en el infrarrojo cercano, donde el tejido es más “transparente”. De esta forma, mediante CO, han investigado los mecanismos subyacentes a la disfunción del nodo senoauricular en insuficiencia cardíaca,<sup>50</sup> o detectar reentradas microanatómicas en el subepicardio y subendocardio de fragmentos de aurícula derecha humana durante FA.<sup>51</sup>

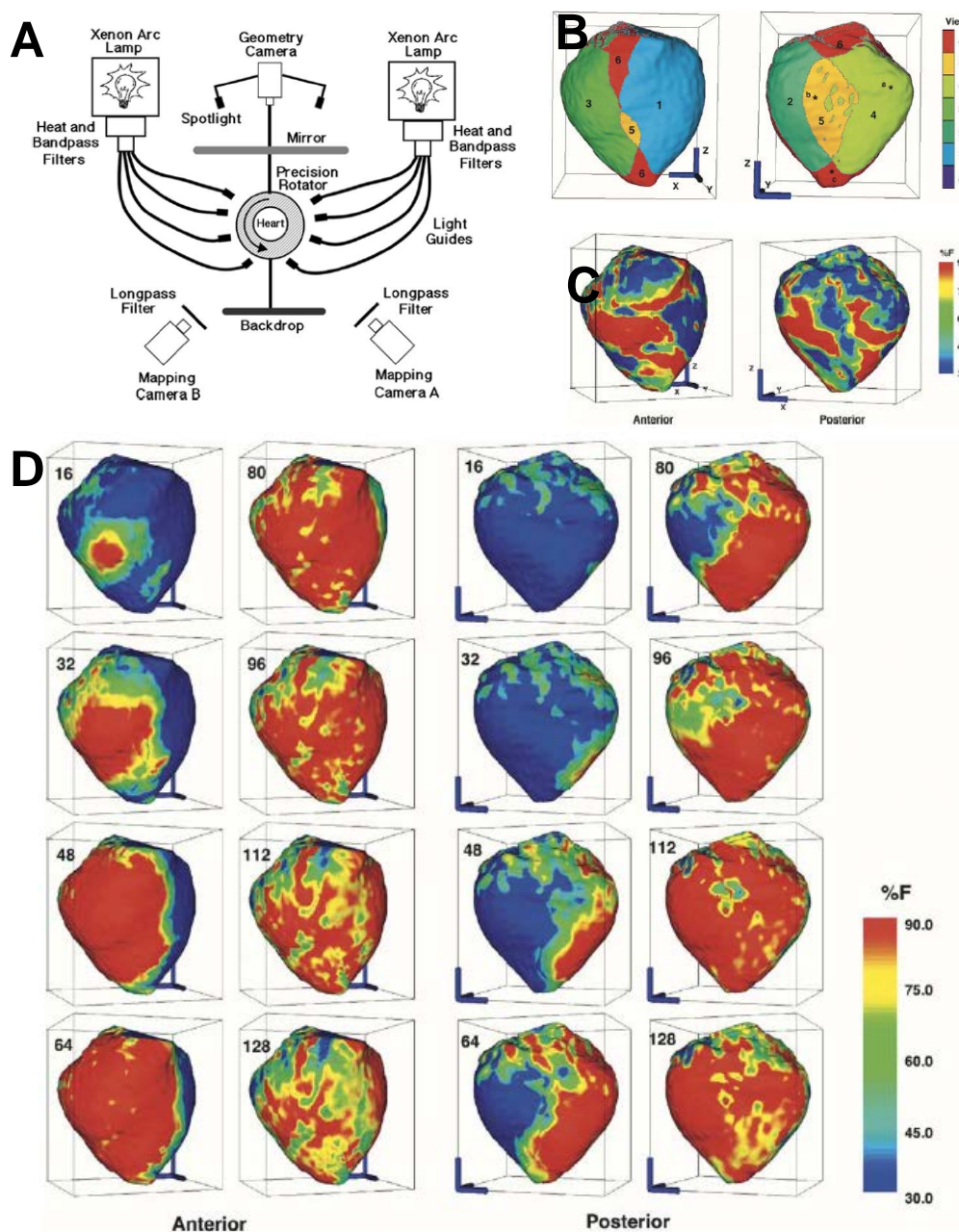
### 1.5.7 Reconstrucción de la superficie epicárdica del corazón y CO panorámico de corazones grandes

Como hemos visto, el CO de la activación eléctrica de la superficie del corazón es una herramienta muy útil para el estudio de las arritmias complejas. Sin embargo, una fuerte limitación del CO tradicional es que la región mapeada se restringe debido al tamaño limitado del detector. Esto hace difícil realizar un seguimiento de los frentes de activación una vez salen del campo de visión. Para solucionar este problema, se ha desarrollado un sistema óptico que mapea panorámicamente la actividad eléctrica en toda la superficie del corazón de cerdo (de tamaño comparable al del humano).<sup>52-56</sup>

Está compuesto por un escáner de superficie para la reconstrucción tridimensional de la superficie epicárdica, y de un sistema de imagen panorámica de fluorescencia que registra la actividad eléctrica. Un software específico mapea los potenciales de acción registrados, sobre la superficie epicárdica reconstruida. Como resultado se obtiene un CO de alta resolución y con continuidad espacial. Además, como las coordenadas espaciales de los puntos de registro son conocidas, esto hace posible calcular con precisión parámetros que requieren información geométrica, como por ejemplo la velocidad de propagación del frente de activación.

La **Figura 26A** muestra el esquema del montaje utilizado. Consta, por una parte, de un escáner de superficie (*geometry camera*) para la medición de la geometría epicárdica. Por otra, del sistema de imagen panorámica, que consta de 2 cámaras CCD (*mapping cameras A y B*), dos lámparas de 450 W, dos conjuntos de 4 fibras ópticas para guiar la luz, y un espejo. Las cámaras están en frente del espejo y separadas 90° entre sí. Esto permite que cada cámara obtenga una visión directa, y otra a través del espejo, con lo que en total se obtienen 4 vistas diferentes. Estas 4 vistas se fusionan utilizando el modelo geométrico obtenido por el escáner de superficie.<sup>52-56</sup>

La **Figura 26B** muestra las vistas anterior y posterior de la superficie del corazón. A cada región se le ha asignado un número (1 visión directa de la cámara A; 2 visión de A a través del espejo; 3 visión directa de la cámara B; 4 visión de B a través del espejo; 5 Zona de solapamiento; 6 borde). En la **Figura 26C** podemos ver las vistas anterior y posterior de los niveles de fluorescencia en un instante de tiempo concreto del corazón en FV.



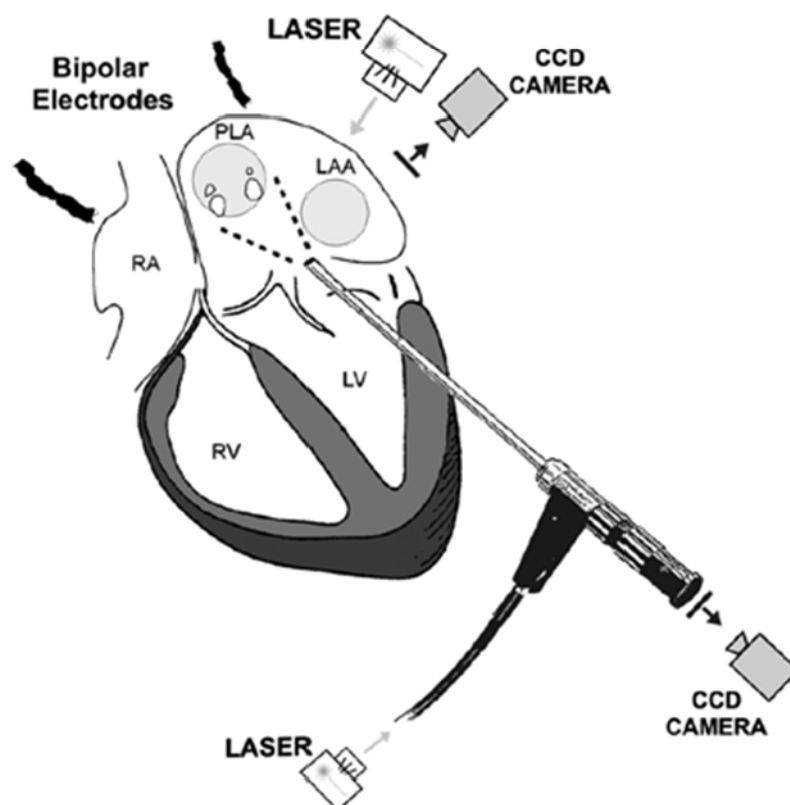
**Figura 26.** A: Esquema del sistema de reconstrucción de la superficie epicárdica, y de registro de fluorescencia en modo panorámico. B: Vistas anterior y posterior de la superficie epicárdica reconstruida a partir de la información del scanner de superficie. C: Vistas anterior y posterior de los niveles de fluorescencia en un instante concreto en un corazón con FV. D: Imágenes de la secuencia de activación de un frente estimulado en distintos instantes de tiempo tras el estímulo (cada 16 ms). En la izquierda se muestra la vista anterior, y en la derecha la posterior. La escala de colores representa el nivel de fluorescencia, y va desde el rojo (tejido totalmente despolarizado), hasta el azul (tejido en reposo, totalmente polarizado). Se puede apreciar como la propagación del frente de activación es mucho más homogéneo que en el caso de la FV. Adaptado de la referencia <sup>57</sup>.

La **Figura 26D** muestra la vista anterior (izquierda) y posterior (derecha) de la activación en un frente estimulado. El punto de estimulación está situado en el centro de la mancha roja de la vista anterior a los 16 ms. En ese punto nace el frente de activación y se va propagando a lo largo del tiempo por el resto de la superficie epicárdica. Se muestran varias imágenes de la secuencia de activación (a los 16 ms, a los 32 ms, etc.). La escala representa el nivel de fluorescencia, de tal manera que el rojo representa tejido totalmente despolarizado, mientras que el azul representa el tejido totalmente polarizado (en reposo).

### 1.5.8 CO endocárdico y epicárdico simultáneo en modelos experimentales de FA

El cartografiado de la superficie endocárdica de la pared posterior de la aurícula izquierda permite el seguimiento de la dinámica de la FA en la región donde los procedimientos de ablación basados en catéter tienen más éxito en la terminación de la FA en pacientes, lo que subraya la importancia de estudiar la dinámica de AF desde el interior de la aurícula izquierda.<sup>30, 58, 59</sup>

A continuación, se proporciona una breve descripción de la metodología utilizada en algunos trabajos experimentales recientes a modo de ejemplo.<sup>30, 58, 59</sup> Se implementó CO epicárdico de la aurícula izquierda (pared posterior u orejuela) y se complementó con CO endocárdico (pared posterior u orejuela) utilizando un endoscopio rígido de doble canal (ángulo de visión de 90 grados) o un boroscopio acoplados a una cámara CCD (80x80 píxeles). Tras excitar con un láser la superficie epicárdica, se utilizó Di-4-ANEPPS para obtener fluorescencia sensible al voltaje. Esta fluorescencia emitida se proyecta sobre una cámara de vídeo CCD (80x80 píxeles) y que adquiría a una velocidad de 800 imágenes por segundo. El área de la superficie epicárdica registrada fue de unos 14 cm<sup>2</sup>. El boroscopio se introdujo a través de la pared anterior del ventrículo izquierdo, cruzando la válvula mitral y enfocando a la superficie endocárdica del pared auricular izquierda posterior (unos 4 cm<sup>2</sup>) lo que permitió la visualización de las cuatro venas pulmonares (**Figura 27**). La luz láser (532 nm, verde) se llevaba a la zona de interés en el endocardio a través del canal de excitación del endoscopio mediante una guía de luz apta para su uso con líquido. Se obtuvieron películas de CO epicárdico y endocárdico simultáneos durante FA. En el **Capítulo 5** se muestran algunos ejemplos de los diferentes patrones de activación observados.



**Figure 27.** Representación esquemática del montaje experimental establecido para CO endo-epicárdio simultáneo. Un boroscopio rígido se introduce a través de la pared anterior del ventrículo izquierdo y el orificio de la válvula mitral y se enfoca en la superficie endocárdica de la aurícula izquierda posterior. Una cámara CCD está acoplada al boroscopio y la iluminación láser se proporciona a través de una guía de luz acoplada a la parte inferior del boroscopio. En este ejemplo, el CO epicárdico se realiza en la orejuela izquierda (de Filgueiras-Rama et al.<sup>59</sup>). En lugar de un boroscopio se puede utilizar un endoscopio, cuyo montaje se detalla en la **Figura 4** del **Capítulo 5**.





## Capítulo 2

# **Antecedentes, Hipótesis y Objetivos**



## 2.1 Antecedentes, hipótesis y objetivos del Capítulo 3

La muerte súbita cardíaca es una causa muy importante de muerte en pacientes con insuficiencia cardíaca.<sup>60</sup> El remodelado electrofisiológico inducido por la insuficiencia cardíaca ha sido identificado como un elemento clave en el estado proarrítmico de estos pacientes.<sup>61</sup> A su vez, el estiramiento crónico al que pueden estar sometidos los ventrículos en insuficiencia cardíaca, es un factor potencialmente asociado con dicho remodelado electrofisiológico.<sup>62</sup>

Además, el empeoramiento del estado o nuevos episodios agudos de insuficiencia cardíaca, como ocurre por ejemplo en la taquicardiomiopatía, a menudo se asocian con un aumento agudo de las presiones intraventriculares. Este factor, por sí solo, también puede generar arritmias.<sup>63-65</sup> De hecho, datos recientes en pacientes con insuficiencia cardíaca han puesto de relieve el importante papel proarrítmico de los aumentos agudos en las presiones intraventriculares.<sup>66</sup> En ese estudio, el riesgo de eventos de taquicardia o fibrilación ventricular para un paciente concreto, se duplicó en los días en los que las presiones específicas del sujeto aumentaban de forma aguda en comparación con sus valores de presión media.<sup>66</sup>

Además, la insuficiencia cardíaca se asocia con numerosas distorsiones iónicas, que pueden ser especialmente frecuentes en estados descompensados que requieren hospitalización. Estas distorsiones iónicas incluyen bajos niveles de sodio, potasio y magnesio que asociados con niveles significativamente más altos de catecolaminas circulantes, pueden predisponer a arritmias ventriculares.<sup>67</sup>

Se ha demostrado que el tratamiento del remodelado electrofisiológico de la insuficiencia cardíaca con fármacos antiarrítmicos convencionales no disminuye las tasas de muerte súbita.<sup>68</sup> De hecho, sólo las terapias crónicas dirigidas a mejorar las condiciones hemodinámicas y humorales de los pacientes han demostrado disminuir la muerte súbita en la insuficiencia cardíaca.<sup>60</sup>

Nuestra hipótesis es que el aumento de la presiones intraventriculares o/y el medio extracelular acidificado y adrenérgico al que estos pacientes pueden estar sometidos, podría desempeñar un papel dañino tan importante como el del propio remodelado de la insuficiencia cardíaca, en lo que a arritmias se refiere.

Para poner a prueba nuestra hipótesis, se utilizó un modelo experimental porcino de insuficiencia cardíaca con el objetivo de cuantificar, mediante cartografiado óptico y ECG volumétrico, las contribuciones individuales y combinadas al sustrato proarrítmico, así como las interacciones entre: 1) el remodelado electrofisiológico de la insuficiencia cardíaca, 2) una presión intraventricular elevada, y 3) la presencia de un medio extracelular acidificado y adrenérgico.



## 2.2 Antecedentes, hipótesis y objetivos del Capítulo 4

Aún hoy en día existe controversia sobre los mecanismos que mantienen la fibrilación ventricular (FV).<sup>69</sup> Varios modelos experimentales diferentes han mostrado ondas espirales generadas por fuentes periódicas de alta frecuencia (rotores),<sup>70</sup> múltiples ondas errando aleatoriamente,<sup>71</sup> o incluso activaciones focales,<sup>72</sup> como posibles mecanismos subyacentes al mantenimiento de la FV. Los estudios previos en corazones de gran animal no han conseguido identificar ondas espirales sostenidas en el epicardio, y solamente han registrado actividad reentrante de corta duración.<sup>53-56, 73-75</sup> En el corazón humano, parecen coexistir frentes espirales epicárdicos (rotores)<sup>76, 77</sup> o intramurales (“pergaminos”)<sup>78</sup> de corta duración, junto con propagación aleatoria.<sup>77</sup>

Nuestra hipótesis es que, bajo ciertas condiciones, la FV puede ser mantenida por uno o más rotores estables y detectables en el epicardio de corazones cuyo tamaño es similar al de un corazón humano. Se sabe que el acortamiento del potencial de acción por medio de un incremento de la conductancia en los canales de potasio acelera la reentrada.<sup>79-81</sup> Además, un estudio reciente mostró que el bloqueo de los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) promueve desfibrilación espontánea de la FV en sus fases iniciales,<sup>82</sup> lo que pone de relieve el papel potencialmente importante de estos canales en el mantenimiento de la FV. Por ello, para probar nuestra hipótesis, utilizamos un modelo de corazón porcino perfundido de manera continua, y provocamos una FV acelerada mediante la apertura de los canales  $K_{ATP}$  con cromakalima, un agonista de la  $I_{K-ATP}$  que acorta la refractariedad ventricular.<sup>81, 83</sup>

Nuestro objetivo fue estudiar mediante cartografiado óptico de la dinámica de los rotores tanto en la FV “basal”, como después de su aceleración con cromakalima, para evaluar si uno o más rotores persistentes se pueden detectar epicárdicamente sosteniendo la FV a nivel local, regional o global. También se evaluó si la aceleración de la dinámica de la FV revela diferencias anatómicas significativas en las frecuencias de activación, organización de la FV, o/y ubicación de los rotores persistentes. Por último, comprobamos si existe correlación espacial entre el registro de potenciales fraccionados y la presencia de rotores persistentes. Para ello, a partir de los registros de cartografiado óptico, obtuvimos pseudo electrogramas bipolares que simulaban los que registrarían los catéteres de electrofisiología convencionales en el ámbito clínico.

## 2.3 Antecedentes y objetivos del Capítulo 5

El procedimiento de aislamiento de venas pulmonares mediante ablación con catéter para forzar la desconexión eléctrica de la aurícula y las fuentes de potenciales ectópicos presentes en las venas pulmonares de pacientes con FA paroxística, del que fueron pioneros Haïsaguerre y colegas,<sup>84</sup> se ha ido extendiendo progresivamente a una población mucho más heterogénea, a veces incluyendo una ablación más extensa con la creación de líneas adicionales o abatimiento de zonas de potenciales fraccionados.<sup>85</sup> A pesar de que han aparecido nuevos desarrollos tecnológicos destinados a simplificar los procedimientos de ablación de FA y aumentar su seguridad<sup>86</sup> (dispositivos *single shot* como el catéter PVAC, navegación remota basada en dispositivos mecánicos –robot Amigo- o magnéticos –Stereotaxis-, catéteres con sensor de contacto, etc.) la mayoría de los procedimientos de ablación de FA todavía se asocian con tasas de éxito poco satisfactorias a largo plazo, particularmente en pacientes con FA persistente y de larga duración.<sup>85</sup> Creemos que estos resultados, a menudo frustrantes, son el resultado de las limitaciones intrínsecas de una estrategia de ablación que, durante las dos últimas décadas, ha sido puramente anatómica y ha prestado escasa atención a los mecanismos subyacentes de la arritmia.

Muy recientemente, ciertos enfoques encaminados a la detección y localización de las fuentes que mantienen la FA han dado lugar a un aumento de la especificidad en los procedimientos de ablación.<sup>87-96</sup> Estos enfoques han obtenido tasas de recurrencia a largo plazo considerablemente más bajas que las técnicas “estándar”. Estas novedosas técnicas de ablación con bases mecanicistas tienen el potencial de trasladar los procedimientos de cartografiado y análisis utilizadas en modelos experimentales animales (por ejemplo, análisis espectral y de fases), a terapias de ablación basadas en un cartografiado mejorado de la FA en los pacientes. Estos nuevos enfoques están basados en un cuidadoso análisis de los patrones fibrilatorios en los pacientes de FA, a menudo obtenidos a través de diferentes sistemas de cartografía multi-electrodo (mapeo con catéteres *basket*, cartografía de la superficie corporal o la imagen electrocardiográfica desarrollada por el laboratorio de Rudy). De hecho, podría decirse que estos nuevos métodos han nacido como resultado de los conocimientos sobre mecanismos obtenidos mediante estudios experimentales de cartografiado óptico y simulaciones por ordenador de la dinámica de la FA.

El objetivo del **Capítulo 5** es revisar brevemente lo siguiente: 1) teorías que compiten tratando de explicar los mecanismos subyacentes al mantenimiento de la FA; 2) diferentes metodologías para cartografiar la actividad eléctrica durante la FA; 3) los más recientes enfoques de ablación mecanicistas dirigidos a la detección y abatimiento de los directores de la FA y sus resultados; y 4) las controversias y las líneas de futuro en el intento de aumentar la comprensión de los mecanismos de la FA y de mejorar los resultados de los procedimientos de ablación, para beneficio del paciente.





## Capítulo 3

**Increased intraventricular pressures are as harmful as the electrophysiological substrate of heart failure in favoring sustained reentry in the swine heart**

*Heart Rhythm 2015; 12:2172-2183.*



# Increased intraventricular pressures are as harmful as the electrophysiological substrate of heart failure in favoring sustained reentry in the swine heart



Jorge G. Quintanilla, MEng,<sup>\*†</sup> Javier Moreno, MD, PhD,<sup>\*‡</sup> Tamara Archondo, MD,<sup>\*</sup> Elena Usandizaga, MEng,<sup>\*</sup> Roberto Molina-Morúa, MEng,<sup>\*</sup> Cruz Rodríguez-Bobada, VMD, PhD,<sup>§</sup> Pablo González, VMD,<sup>§</sup> María Jesús García-Torrent, PhD,<sup>\*</sup> David Filgueiras-Rama, MD, PhD,<sup>\*†</sup> Nicasio Pérez-Castellano, MD, PhD,<sup>\*</sup> Carlos Macaya, MD, PhD,<sup>\*</sup> Julián Pérez-Villacastín, MD, PhD<sup>\*</sup>

From the <sup>\*</sup>Optical Mapping Laboratory, Arrhythmia Unit, Cardiovascular Institute, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain, <sup>†</sup>Advanced Development in Arrhythmia Mechanisms and Therapy, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, Spain, <sup>‡</sup>Arrhythmia Unit, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain, and <sup>§</sup>Experimental Medicine and Surgery Unit, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain.

**BACKGROUND** Heart failure (HF) electrophysiological remodeling (HF-ER) often includes the effect of chronically increased intraventricular pressures (IVPs) and promotes ventricular tachycardia/ventricular fibrillation (VT/VF). In addition, acutely increased IVPs have been associated with a higher rate of VT/VF episodes in chronic HF.

**OBJECTIVE** We hypothesized that increased IVPs and/or an ionic-imbalanced (acidified), catecholamine-rich (adrenergic) milieu (AA milieu) may contribute as much as HF-ER to the substrate for reentry in HF. We used a porcine model of tachycardiomyopathy and evaluated the individual/combined contributions of (1) increased IVPs, (2) HF-ER, and (3) an AA milieu.

**METHODS** HF-ER was induced in 7 pigs by rapid pacing. Seven pigs were used as controls. Hearts were isolated and Langendorff perfused. Programmed ventricular stimulation was conducted under low or increased IVP and normal/AA milieu (4 combinations). Epicardial optical mapping was used to quantify conduction velocity (CV), action potential duration (APD), and dispersion of repolarization (DoR).

**RESULTS** HF-ER decreased CV (−34%;  $P = .002$ ) and increased APD (11%;  $P = .024$ ) and DoR (21%;  $P = .007$ ). Increased IVP amplified DoR (36%;  $P < .001$ ) and decreased CV (−17%;  $P = .001$ ) and APD (−8%;  $P < .001$ ). The AA milieu consistently

modified only APD (−9%;  $P < .001$ ) and led to amplified inter-/intra-subject heterogeneity. Increased IVP similarly raised the odds of inducing sustained VT/VF as the presence of HF-ER (>6-fold).

**CONCLUSION** By magnifying DoR, decreasing CV, and shortening APD, increased IVP was as harmful as HF-ER in favoring the substrate for sustained reentry in this model. The AA milieu contributed to a much lesser extent. Thus, a stricter control of IVP might be postulated as a useful add-on antiarrhythmic strategy in HF.

**KEYWORDS** Optical mapping; Reentry; Arrhythmias; Heart failure; Remodeling; Stretch

**ABBREVIATIONS** AA = acidified and adrenergic; APD = action potential duration; BDCL = basic drive cycle length; CHF = chronic heart failure; CV = conduction velocity; DoR = dispersion of repolarization; ECG = electrocardiogram/electrocardiographic; GEE = generalized estimating equations; HF = heart failure; HF-ER = heart failure electrophysiological remodeling; IVP = intraventricular pressure; LV = left ventricular; OR = odds ratio; SCD = sudden cardiac death; VF = ventricular fibrillation; VT = ventricular tachycardia; WL = wavelength

(Heart Rhythm 2015;12:2172–2183) © 2015 Heart Rhythm Society. All rights reserved.

This study was supported by grants from the Fondo Europeo de Desarrollo Regional and the Instituto de Salud Carlos III (grant nos. RD06/0003/0009 [REDINSCOR] and RD12/0042/0036 [RIC]) and the Spanish Society of Cardiology (beca investigación básica SEC-2009). The Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the Pro-CNIC Foundation. **Address reprint requests and correspondence:** Mr Jorge G. Quintanilla, Arrhythmia Unit, Cardiovascular Institute, Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos S/N, CP 28040 Madrid, Spain. E-mail address: jgarciaqui.hcsc@salud.madrid.org.

## Introduction

Sudden cardiac death (SCD) is a major cause of death in patients with heart failure (HF).<sup>1</sup> HF electrophysiological remodeling (HF-ER) has been identified as a major element in the proarrhythmic state of these patients.<sup>2</sup> Accordingly, the persistent stretch to which the ventricles may be subjected to is a factor potentially associated with HF-ER.<sup>3</sup>

Also, HF-status worsening or de novo acute HF episodes, as in the setting of tachycardiomyopathy, are often associated with acutely increased intraventricular pressures (IVPs), and this factor itself might also promote arrhythmias.<sup>4,5</sup> Indeed, a recent study in patients with HF have highlighted the important proarrhythmic role of acute increases in IVP. In that study,<sup>6</sup> the risk of ventricular tachycardia/ventricular fibrillation (VT/VF) events for a particular patient was doubled on days when subject-specific pressures were acutely increased compared with their average pressure values.

In addition, HF is associated with numerous ionic distortions, which might be especially prevalent in decompensated status requiring hospitalization. These ionic features include low levels of sodium, potassium, and magnesium that associated with significantly higher levels of circulating catecholamines may predispose to ventricular arrhythmias.<sup>7</sup>

Treating HF-ER with conventional antiarrhythmic drugs has been demonstrated not to diminish SCD rates.<sup>1,8</sup> In fact, only chronic therapies aimed to improve the hemodynamic and humoral conditions have been proven to decrease SCD in HF.<sup>1</sup> We hypothesized that the increased IVP and/or the acidified and adrenergic extracellular milieu (AA milieu) to which these patients can be subjected to might play a deleterious role as powerful as the HF-ER. To test our hypothesis, we used a multivariable experimental porcine model of HF induced by rapid pacing to examine the individual and combined contributions to the proarrhythmic substrate of (1) HF-ER, (2) an increased IVP, and (3) the presence of an AA milieu.

## Methods

A detailed methods section is available in the [Online Supplement](#). The present study was conducted in accordance with European guidelines for the care and use of laboratory animals (2010/63/EU). Approval was granted by the local committee of animal welfare. All surgical procedures were performed under deep anesthesia (ketamine 20 mg/kg, propofol 6 mg/kg, atracurium besylate 0.2 mg/kg and 1.25 mg/(kg · h), fentanyl 0.005 mg/(kg · h), and isoflurane 2%).

### HF-ER model

HF-ER was induced in 7 Pietrain pigs by high-rate ventricular pacing (190 beats/min) for ~4 weeks until clear symptoms of HF developed. Transthoracic echocardiographic evaluations were performed immediately before pacemaker implantation and 10 minutes after deactivating the pacemaker, immediately before explanting the heart.<sup>9</sup> In our previous study,<sup>9</sup> sham-operated animals did not show any difference with not-implanted animals; therefore, 7 pigs did not undergo pacemaker implantation and were used as controls.

### Isolated heart preparation and experimental protocol

Once pigs were anesthetized, hearts were exposed, excised, cooled, connected to a Langendorff apparatus, and defibrillated

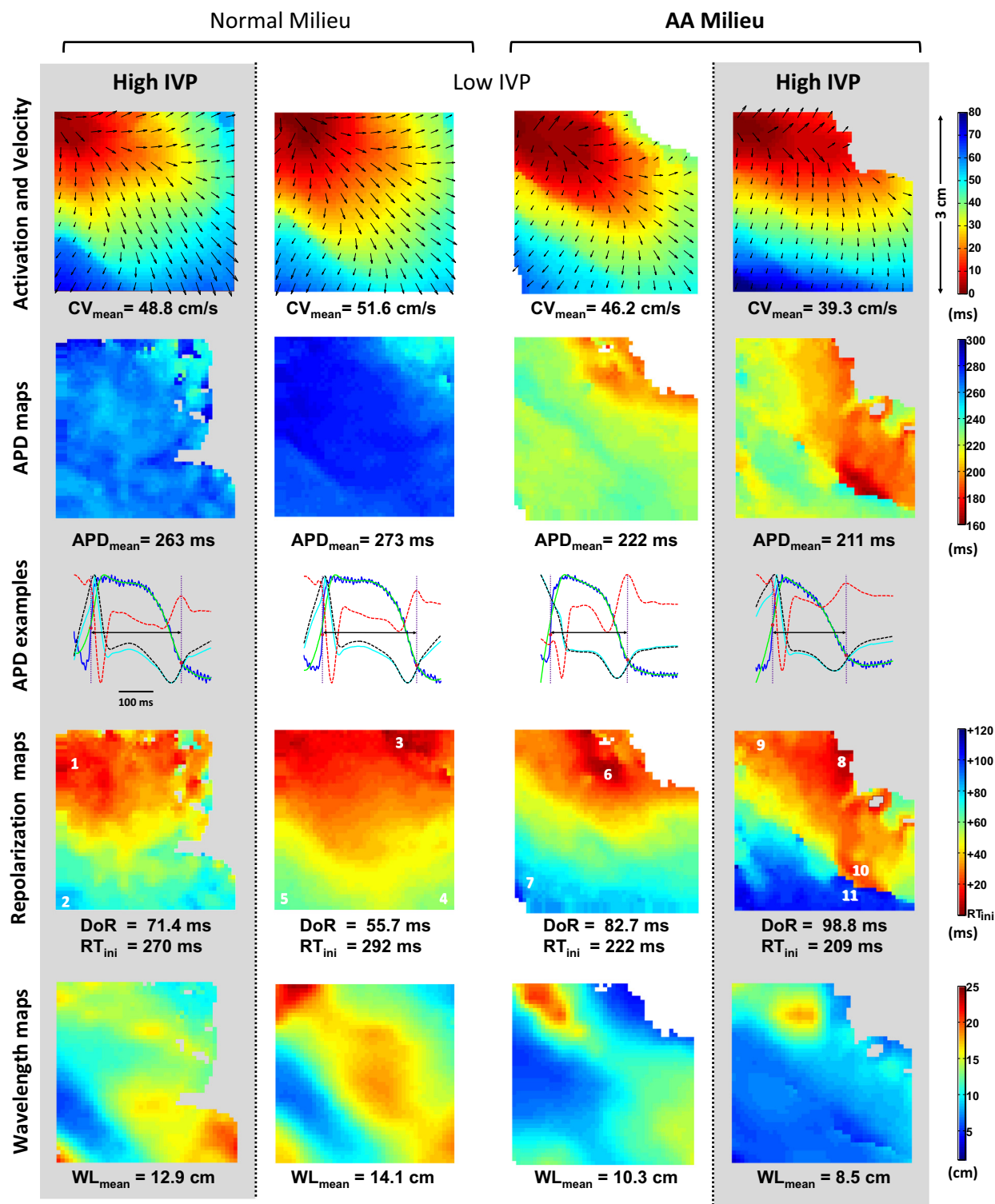
to sinus rhythm once they reached 37°C.<sup>9,10</sup> Arrhythmia inducibility assessment and optical recordings were performed under low or high left ventricular (LV) IVP, alternating a normal Tyrode's solution and an AA-milieu surrogate Tyrode's solution with the aim of approximating the major ionic changes found in patients with chronic heart failure (CHF) treated with non-potassium-sparing diuretics<sup>7</sup> (lower levels of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Mg<sup>2+</sup> and noradrenaline in a progressive concentration to achieve ~100 beats/min before the stimulation protocol). As in previous studies,<sup>4,11,12</sup> increased IVP was achieved by inflating a fluid-filled balloon to increase the LV end-diastolic pressure from ~0 mm Hg (low IVP) to ~20 mm Hg (high IVP). Volume-conducted electrocardiogram (ECG), perfusion pressure, and IVP were digitally monitored (Prucka CardioLab, General Electric Medical, Milwaukee, USA). Perfusion pressure was always higher than IVP in order to prevent subendocardial ischemia. The initial type of perfusion and the low/high IVP acquisition order were randomly varied.

In order to reduce motion artifacts, gentle pressure was applied to the posterior region to stabilize the anterior surface of the ventricle against the imaging window, only for the time needed to record the set of movies at each experimental setting.<sup>9,10,13</sup> We continuously monitored the perfusion pressure changes to ensure that this gentle compression did not produce cardiac ischemia or enhance the vulnerability to arrhythmias.

After focusing the field of view on the anterior surface of the LV, ventricular pacing (500 and 300 ms basic drive cycle length [BDCL] + S2, 10 ms over the effective refractory period) was performed close to the left upper corner ([Online Supplemental Figure S1](#)). We recorded the local emitted fluorescence (Di-4-ANEPPS,<sup>9,10</sup> 800 frames per second) from S1 and S2 epicardial wavefronts. In 1 HF-ER heart, optical mapping was not performed because of unsolvable technical problems at the time of the experiment.

### Optical data processing and analysis

The activation and repolarization dynamics of S1 and S2 waves were analyzed using custom-made software. The measurements at each setting were routinely averaged from 3 movies under identical conditions. In total, more than 600 waves were analyzed to obtain the cumulative data. Activation time of each pixel was calculated at the time of (dV/dt)<sub>max</sub> after suitable preconditioning (cone-shaped kernel time-space smoothing)<sup>9,10</sup> and filtering (zero-phased 50th-order low-pass Butterworth filter; [Online Supplemental Figure S2](#)).<sup>14</sup> Then, activation maps, local conduction velocity (CV) vectors, and their averaged magnitude value (CV<sub>mean</sub>) over the whole field of view were computed. For repolarization, we used a validated method<sup>15</sup> that has been extensively used to obtain repolarization times from optical data at the time of (d<sup>2</sup>V/dt<sup>2</sup>)<sub>max</sub> in the absence of electromechanical uncouplers.<sup>15–17</sup> This method was demonstrated to provide accurate repolarization times even in the presence of substantial levels of motion artifact.<sup>15</sup>

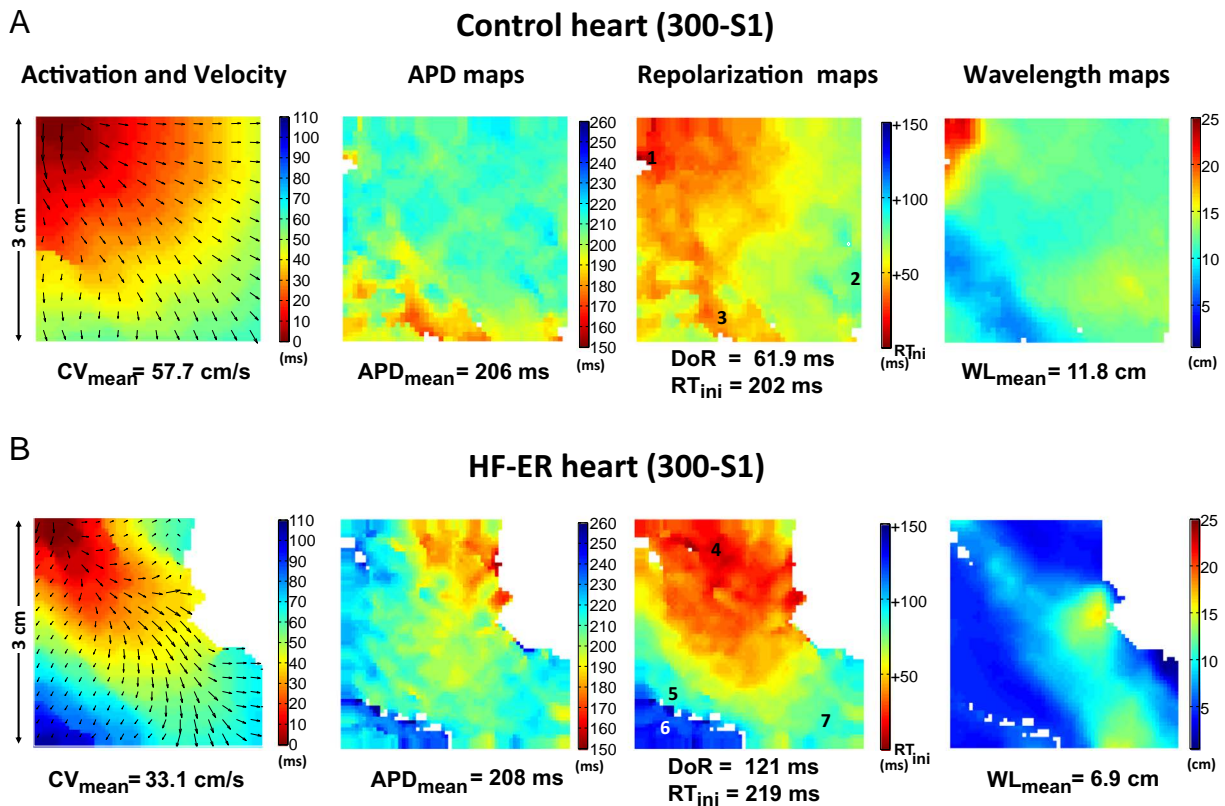


**Figure 1** Optical mapping measurements in control heart 2 (500-ms basic drive cycle length S2 beats). Third row shows optical action potential from the maps in the second row, matching the mean action potential duration (APD) in each setting. The maximum of the red tracings ( $d^2V/dt^2$ ) marks the local repolarization time (see the [Online Supplement](#)). Optical action potentials at the pixels with numbers are shown in [Online Supplemental Figure S4](#) as examples of dispersion of repolarization (DoR). AA = acidified and adrenergic; CV = conduction velocity; IVP = intraventricular pressure; RT<sub>ini</sub> = earliest repolarization time; WL = wavelength.

Nevertheless, 3 hearts (2 control and 1 HF-ER) were excluded from the repolarization analysis since they exhibited excessive motion artifact to offer totally reliable repolarization data. In the remaining hearts (5 control and

5 HF-ER), repolarization maps were computed and epicardial dispersion of repolarization (DoR) was obtained (see the [Online Supplement](#)). Action potential duration (APD) maps were calculated as the difference between activation and





**Figure 2** Example of activation/velocity, action potential duration (APD), repolarization, and wavelength (WL) maps in a control (A) and a heart failure electrophysiological remodeling (HF-ER) heart (B) (S1 beat, 300-ms basic drive cycle length, normal milieu, and low intraventricular pressure). Note the reduced conduction velocity (CV) and WL and the increased epicardial dispersion of repolarization (DoR) in the HF-ER heart. Optical action potentials at the pixels with numbers are shown in [Online Supplemental Figure S5](#).  $RT_{ini}$  = earliest repolarization time.

repolarization times at each pixel, and their averaged value over the whole map ( $APD_{mean}$ ) was obtained. Wavelength (WL) maps were also computed ( $ICV \times APD$ ) to give an image of the distance between the depolarizing wavefront and the repolarizing tail at each region. [Figure 1](#) illustrates the parameters measured with optical mapping to assess the pro-reentry substrate of each setting in a control heart.

### Arrhythmia inducibility

Induced ventricular arrhythmias were scored as follows: VF, 8 points; sustained VT that changed to VF, 7 points; sustained monomorphic VT, 6 points; nonsustained polymorphic VT, 5 points; nonsustained monomorphic VT, 4 points; run of 3 ventricular ectopies (triplet), 3 points; 2 ventricular ectopies (doublet), 2 points; a single elicited ventricular ectopy, 1 point; and no induced arrhythmia, 0 points. For each heart and setting, the maximum score (worst arrhythmia) was obtained.

### Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used to test for normality. A mixed model based on generalized estimating equations (GEE) was used. Unlike conventional tests that use the assumption of independent cases, GEE consider that cases are correlated (several measurements in different settings within each heart). GEE were also used to perform

multivariable logistic regression in order to quantify the propensity of each factor to favor the induction of sustained arrhythmias. Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  SEM, except when variables did not follow a normal distribution. In such cases and also for ranges of relative changes and arrhythmic scores, data were displayed as median and interquartile range, that is, median ( $P_{25\%}$ – $P_{75\%}$ ). Accordingly, nonparametric tests were used for these data: Mann-Whitney *U*, Wilcoxon signed rank, Spearman correlation, and Jonckheere-Terpstra. A 2-tailed *P* value of  $<.05$  was considered statistically significant.

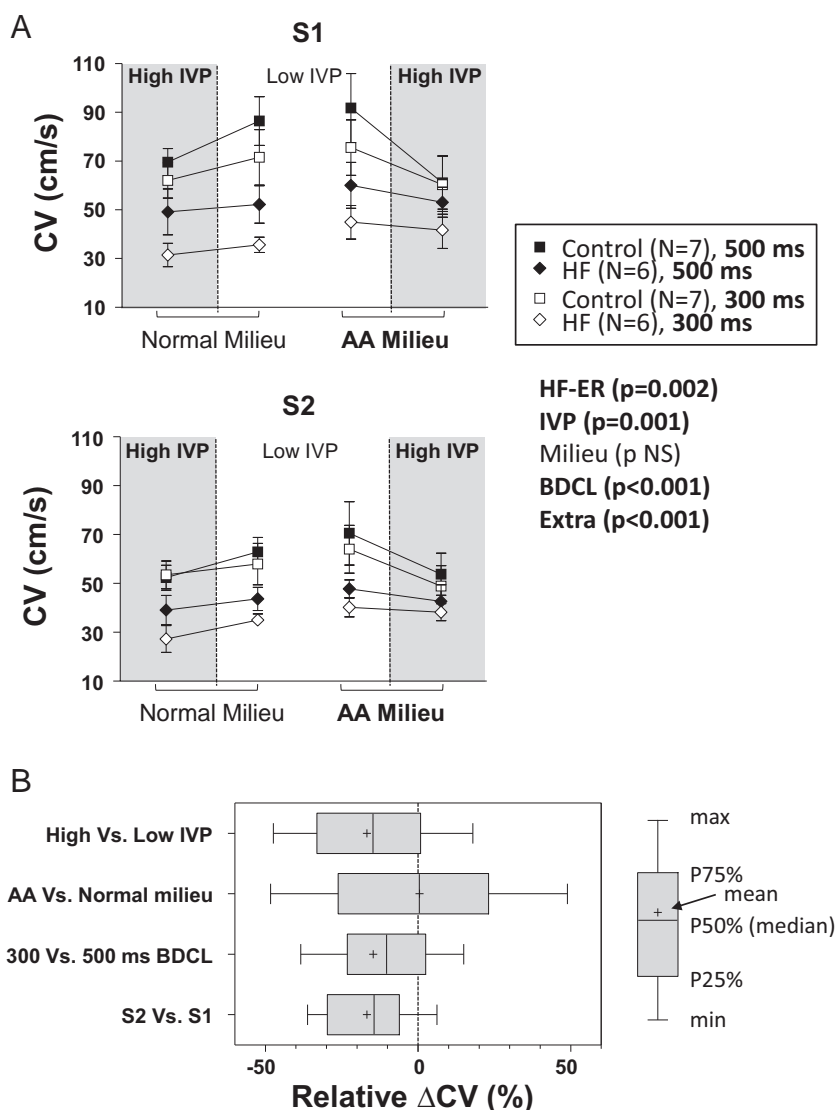
## Results

### HF-ER induction, echocardiographic findings and ECG data

In the HF-ER group, rapid ventricular pacing induced significant overt dilatation and contractile dysfunction ([Online Supplemental Table S1](#)). Volume-conducted ECG data during sinus rhythm are presented in [Online Supplemental Figure S3](#).

### Optical mapping measurements

Optical mapping of the activation/repolarization of paced beats was performed to objectively quantify the pro-reentry substrate at different combinations of factors. Examples of optical mapping measurements are shown in [Figure 1](#) (also



**Figure 3** **A:** Conduction velocity (CV). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. **B:** Relative change in paired measurements of CV. AA = acidified and adrenergic; BDCL = basic drive cycle length; HF = heart failure; HF-ER = heart failure electrophysiological remodeling; IVP = intraventricular pressure; NS = not significant.

see Online Supplemental Figure S4) and Figures 2A and 2B (also see Online Supplemental Figure S5). Here, we comment on the main effects of all the involved factors and some especially relevant interactions.

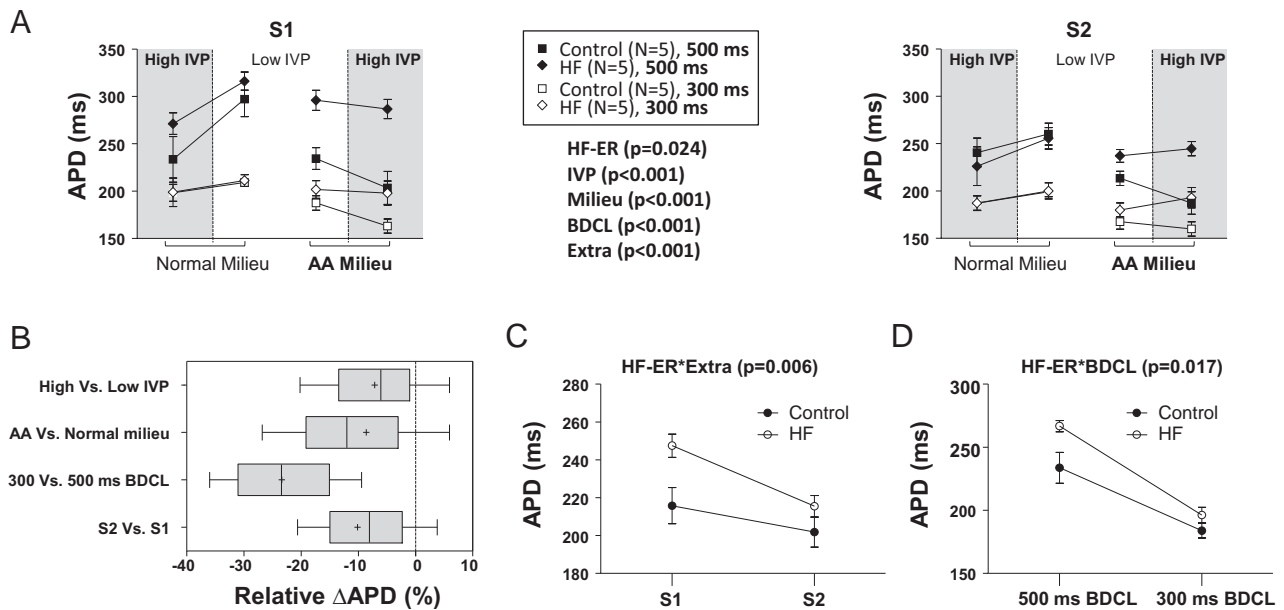
With regard to activation, epicardial CV (Figures 3A and 3B) was lower in HF-ER hearts (average  $-34\%$ ;  $P = .002$ ) and after increasing IVP ( $-17\%$ ;  $P = .001$ ). The AA milieu did not consistently change CV ( $P = 0.47$ ). This was the result of a considerably ( $\geq 20\%$ ) increased CV (control 1 of 7; HF-ER 2 of 6) or decreased CV (control 2 of 7; HF-ER 1 of 6) in some hearts and minor changes in the remaining hearts (control 4 of 7; HF-ER 3 of 6). As expected, pacing at 300-ms BDCL and extrastimuli (S2) slowed propagation by  $16\%$  ( $P < .001$ ) and  $18\%$  ( $P < .001$ ), respectively.

With regard to repolarization-related parameters, we obtained APD<sub>mean</sub> since a short local refractoriness facilitates reentry. APD (Figures 4A and 4B) was significantly shortened by high IVP ( $-8\%$ ;  $P < .001$ ), the AA milieu ( $-9\%$ ;

$P < .001$ ), pacing at 300-ms BDCL ( $-24\%$ ;  $P < .001$ ), and S2 beats ( $-10\%$ ;  $P < .001$ ). On average, APD was longer in HF-ER hearts ( $11\%$ ;  $P = .024$ ), although this difference was less evident in S2 beats ( $P = .006$ ; Figure 4C) and pacing at 300-ms BDCL ( $P = .017$ ; Figure 4D). Indeed, this difference in APD between control and HF-ER hearts was not present in most settings at 300-ms BDCL (see an example in Figure 2).

Also, we obtained DoR, as increased values of this parameter are physiologically linked to reentry. Epicardial DoR (Figures 5A and 5B) was increased by high IVP ( $36\%$ ;  $P < .001$ ), in HF-ER hearts ( $21\%$ ;  $P = .007$ ), and in S2 beats ( $13\%$ ;  $P < .001$ ). The AA milieu and BDCL did not significantly modify epicardial DoR.

We also obtained WL maps since short WLs facilitate reentry. WL<sub>mean</sub> (Figures 6A and 6B) was significantly shortened by HF-ER ( $-28\%$ ;  $P = .039$ ), increased IVP ( $-33\%$ ;  $P < .001$ ), 300-ms BDCL ( $-36\%$ ;  $P < .001$ ), and extrastimuli ( $-28\%$ ;  $P < .001$ ) but not by the AA milieu.



**Figure 4** A: Action potential duration (APD). B: Relative change in paired measurements of APD. C and D: Relevant significant interactions between factors found in APD data. AA = acidified and adrenergic; BDCL = basic drive cycle length; HF = heart failure; HF-ER = heart failure electrophysiological remodeling; IVP = intraventricular pressure.

The effects of HF-ER and increased IVP on optical mapping measurements are displayed in Figure 7, where comparable effects on CV, DoR, and WL at the tissue level are displayed. Of note, although their average effects on APD were opposed (shortened by high IVP and lengthened by HF-ER), at many combinations of factors APD was only slightly increased by HF-ER (<10% [3 of 16 combinations]) or not increased at all (6 of 16 combinations), especially when pacing at the shorter cycle length and/or with extrastimuli.

The significant interactions between factors found in CV, APD, DoR, and WL data are shown in Online Supplemental Figures S6–S9.

### Detailed analysis of the induced arrhythmias

Most sustained arrhythmias were preferentially elicited when pacing at 300-ms BDCL (83%; Online Supplemental Table S2). For this reason, we performed a detailed analysis of the arrhythmias elicited at this pacing rate (14 hearts, 4 settings = 56 maximum values).

Figure 8A shows representative examples of the worst induced arrhythmias in a control and an HF-ER heart. Maximum scores were significantly higher in HF-ER hearts and during increased IVP (Figure 8B), but they were not significantly modified by the AA milieu. Figure 8C shows maximum scores rising when any of the 3 proarrhythmic factors are progressively included. The scores reached by every individual heart and their median scores are shown in Online Supplemental Figure S10.

Finally, in order to weight the contribution of the several factors to individually induce significant arrhythmias pacing at 300 ms ( $n = 56$  scores), we evaluated with an odds ratio (OR) the propensity to induce a maximum score  $\geq 6$  (ie, the worst elicited arrhythmia being a sustained VT or VF).

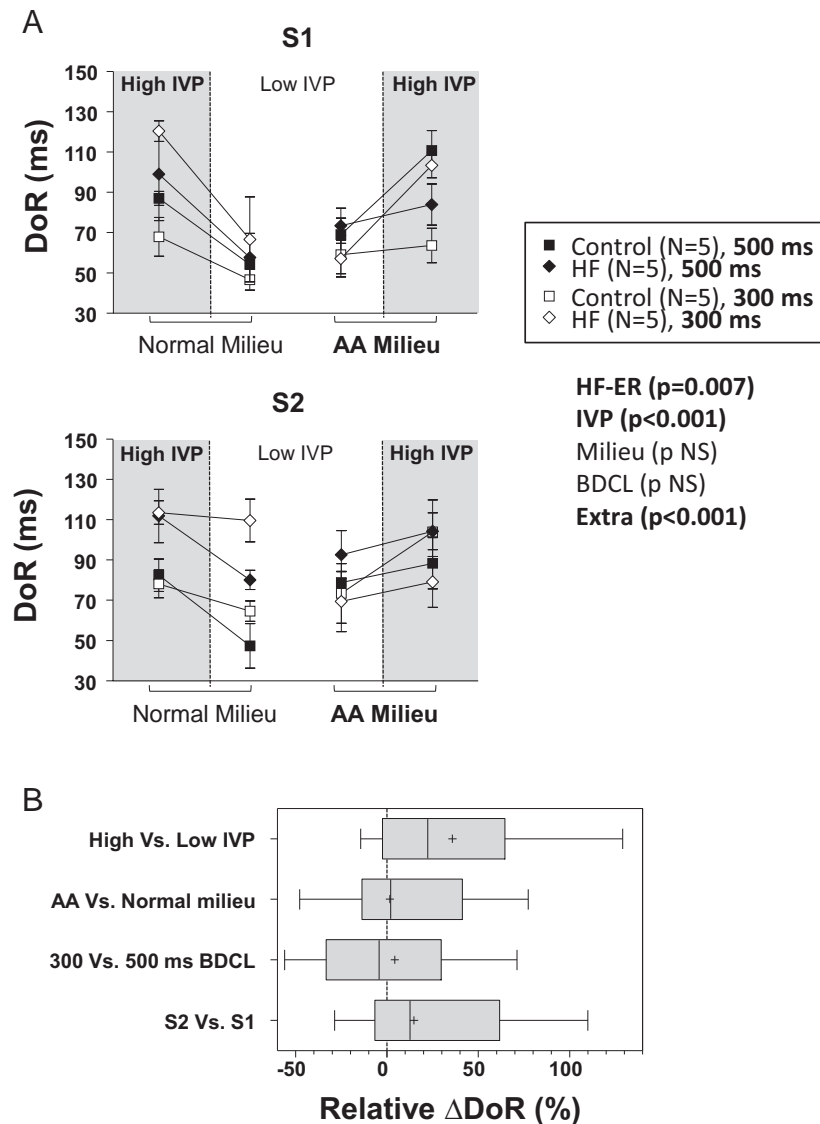
The observed OR was 6.8 ( $CI_{95\%}$  1.2–38.5;  $P = .029$ ) for HF-ER, 6.5 ( $CI_{95\%}$  1.4–31.3;  $P = .020$ ) for increased IVP, and a nonsignificant 2.2 ( $CI_{95\%}$  0.6–7.7;  $P = .215$ ) for the AA milieu. These results suggest that both HF-ER and increased IVP can be similarly harmful for the induction of sustained reentrant arrhythmias.

## Discussion

### Main findings

The present experimental study aimed to quantify the relative weight of 3 key factors potentially involved in the substrate favoring reentry in HF: (1) HF-ER, (2) an increased IVP and, (3) the presence of an AA milieu. To our knowledge, this is the first report of the interaction among these 3 proarrhythmic factors. It is well known that the underlying molecular and ionic mechanisms of HF-ER and the stretch produced by an increased IVP are different. Our main finding is that despite these underlying differences, both factors contributed to proarrhythmia in this large heart model in a similar extent and by analogous mechanisms at the tissue level (increased DoR and decreased CV and WL). Indeed, both factors similarly showed >6-fold increased odds of inducing sustained ventricular tachyarrhythmias. The catecholamine-rich perfusion with minor ionic changes resembling a CHF status (AA milieu) shortened refractoriness and increased both inter- and intra-subject heterogeneity (see Online Supplemental Figure S11), but it seemed to add little to the substrate favoring reentry.

Because of the nature of the induction protocol used, most arrhythmias induced in this study should have been initiated by a reentrant mechanism. Thus, unidirectional block, which is a prerequisite for the onset of reentry, would be favored by the increased DoR promoted by both HF-ER and increased



**Figure 5** **A:** Dispersion of repolarization (DoR). **B:** Relative change in paired measurements of DoR. AA = acidified and adrenergic; BDCL = basic drive cycle length; HF = heart failure; HF-ER = heart failure electrophysiological remodeling; IVP = intraventricular pressure; NS = not significant.

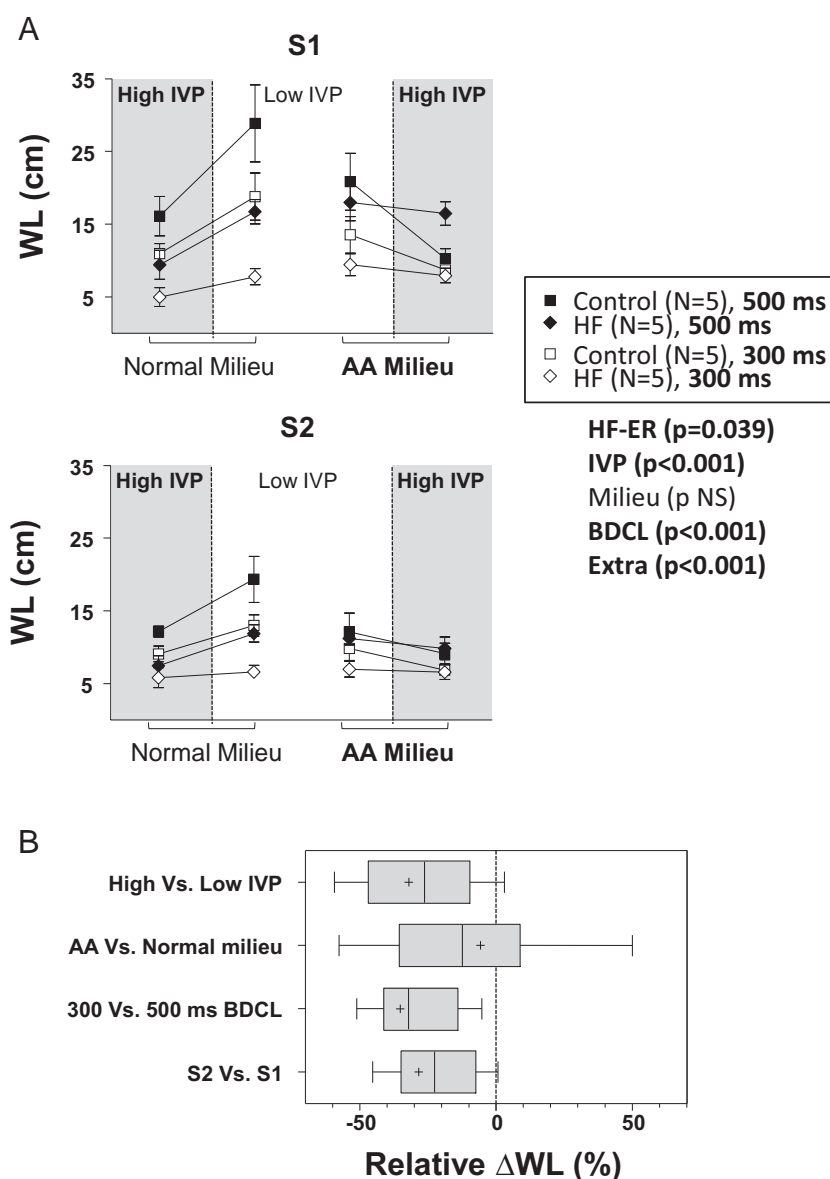
IVP. Furthermore, a reduced CV promoted by both HF-ER and increased IVP, together with the shortened refractoriness promoted by an increased IVP, would act to favor continuance of these reentrant arrhythmias. Conversely to IVP, on average, HF-ER prolonged refractoriness, which theoretically would make reentry less likely. However, as in previous studies,<sup>7,18</sup> this prolongation was found to be rate dependent and was usually minor or even not found at 300-ms BDCL and/or after S2 beats, conditions under which most reentrant arrhythmias were induced.

### HF electrophysiological remodeling

HF-ER was clearly associated with the induction, sustainability, and severity of ventricular arrhythmias, as described previously.<sup>19</sup> Indeed, compared with controls, HF-ER hearts showed 6.8-fold increased odds of inducing sustained ventricular arrhythmias.

Our data show that the induced tachycardiomyopathy was associated with an overt electrophysiological remodeling as demonstrated by a significant increase in APD, especially at the longer BDCL, as reported previously.<sup>9,16,20</sup> With regard to DoR, previous studies have quantified transmural DoR.<sup>14,16,20</sup> Instead, we focused on epicardium and observed an increased DoR in HF-ER hearts. Our data are consistent with previous studies, as increased dispersion of epicardial APD and/or repolarization gradients have been reported in rabbit<sup>18</sup> and dog<sup>21</sup> models of pacing-induced HF, and even in failing human hearts.<sup>14</sup>

With regard to activation, we found a considerably slower CV in the HF-ER group. Most studies have reported similar findings in rapid-pacing models<sup>22,23</sup> and in failing human hearts,<sup>14</sup> although increased CV has been found in other models.<sup>19</sup> In the rapid-pacing model, reduced CV does not appear to be related to a reduced excitability or an increased fibrosis.<sup>22</sup> However, connexin 43 expression is anisotropically



**Figure 6** **A:** Wavelength (WL). **B:** Relative change in paired measurements of WL. AA = acidified and adrenergic; BDCL = basic drive cycle length; HF = heart failure; HF-ER = heart failure electrophysiological remodeling; IVP = intraventricular pressure; NS = not significant.

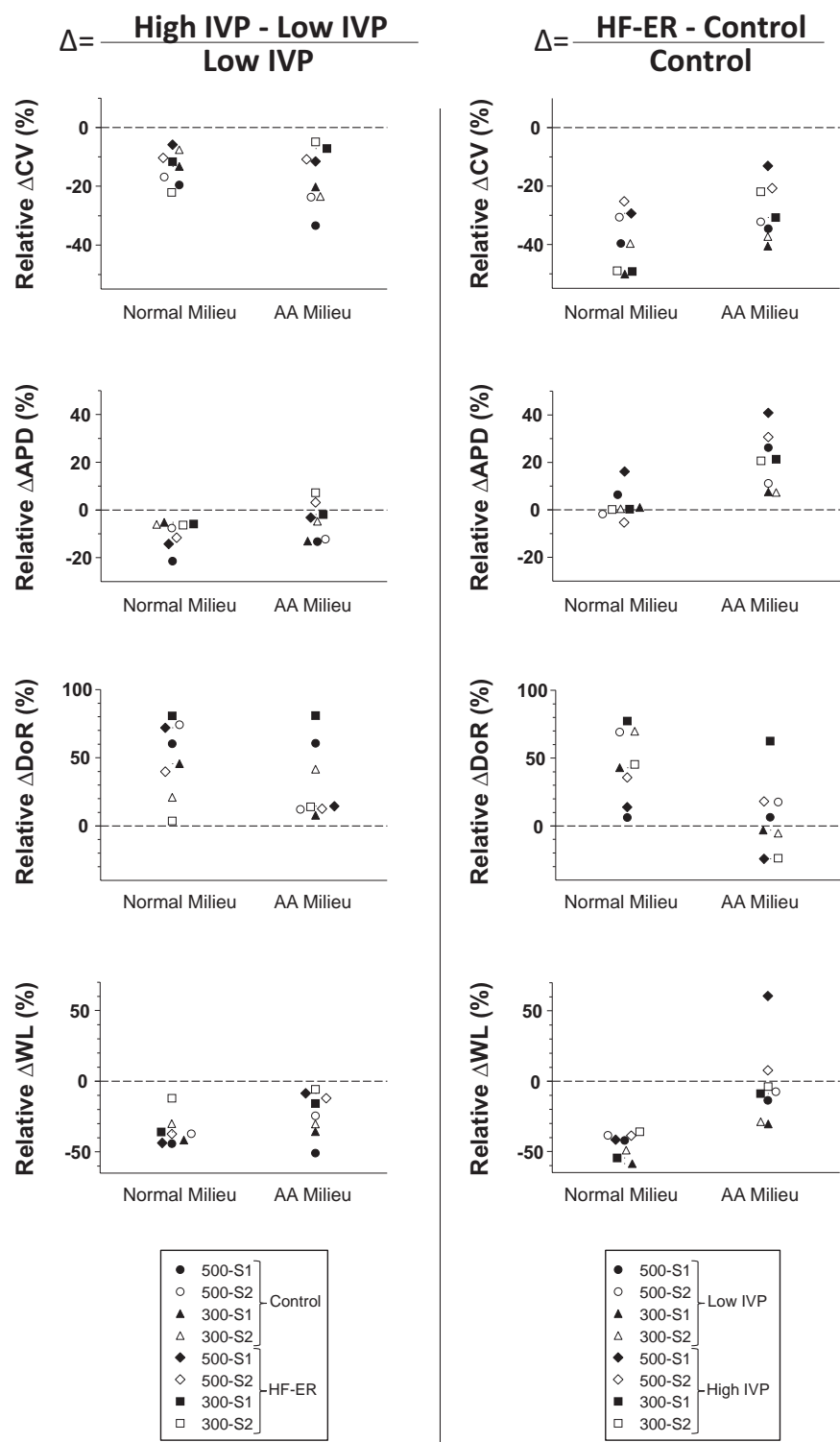
reduced in HF,<sup>14,19,23</sup> and its phosphorylation state and localization is altered (lateralization),<sup>14, 22</sup> which may contribute to gap-junction dysfunction, favoring CV slowing.<sup>22</sup> These electrophysiological changes can promote ventricular arrhythmias since slow CVs have been associated with reentry, either anatomical or functional.

### Increased IVP

In our data, an increased IVP also promoted the induction of sustained arrhythmias, showing an OR similar to the presence of HF-ER. This somehow resembles clinical data, where patients with HF had a 2-fold increased risk of VT/VF on days when intracardiac pressures were increased as compared with their average values.<sup>6</sup> Treatment modalities that, among other biochemical and neurohormonal properties, contribute to maintain adequate filling pressures have

been associated with lower SCD rates or less appropriate implantable cardioverter-defibrillator therapies, including ACE inhibitors, angiotensin II receptor blockers, aldosterone antagonist diuretics, and cardiac resynchronization therapy,<sup>24–26</sup> although additional mechanisms have also been proposed.<sup>3,27</sup>

Mechanistically, we found that increased IVP in our porcine model, similar to HF-ER, significantly decreased CV, but to a lesser extent. Although no changes in CV were found in a study using thin epicardial layers from the rabbit ventricle after acute stretch,<sup>4</sup> decreased CV has been previously reported in 3-dimensional myocardium of dogs and rabbits.<sup>5,12,28,29</sup> This reduction of CV does not appear to be attributable to stretch-activated currents or altered resting membrane potential, but rather a reduction of intercellular resistance with a concurrent increase of effective membrane capacitance.<sup>29</sup> With regard to refractoriness, our findings are



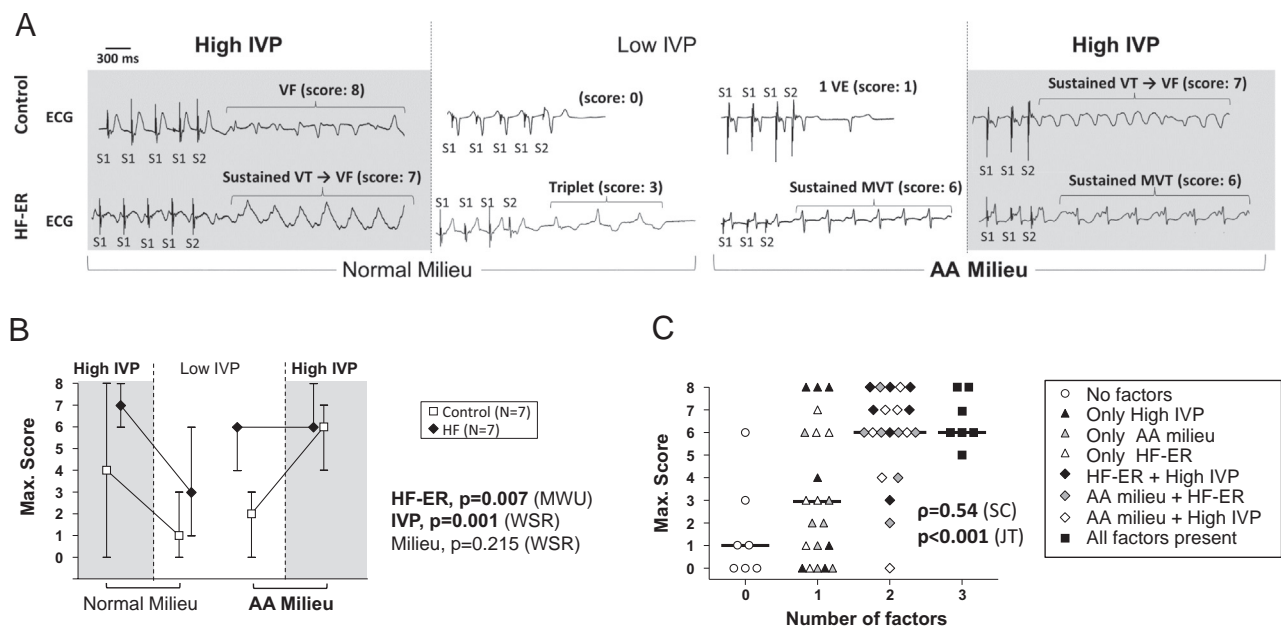
**Figure 7** Comparison of the effects of increased intraventricular pressure (IVP) and heart failure electrophysiological remodeling (HF-ER) as relative change (%). AA = acidified and adrenergic; APD = action potential duration; CV = conduction velocity; DoR = dispersion of repolarization; WL = wavelength.

comparable with those of most experimental studies on acute stretch, reporting a shortened APD<sup>4,5</sup> and an increased dispersion of APD or repolarization times.<sup>4,5,11</sup> Again, both slow CV and increased DoR favor reentry, as in HF-ER hearts.

### AA milieu

Given that CHF, its medical treatment (especially diuretics), and acute HF episodes often entail higher levels of plasma catecholamines and ionic imbalances,<sup>1</sup> we attempted to evaluate their weight in this model. Interestingly, the AA





**Figure 8** Arrhythmia inducibility in control ( $n = 7$ ) and heart failure electrophysiological remodeling (HF-ER) ( $n = 7$ ) hearts. **A:** Volume-conducted electrocardiographic (ECG) examples of ventricular arrhythmias. **B:** Maximum scores at 300-ms basic drive cycle length (BDCL) ( $n = 56$ ). Scores are detailed in Methods section. Since score data did not follow normal distributions, results are displayed as median (symbols) and interquartile range (bars). Both HF-ER and increased intraventricular pressure (IVP) were significantly associated with higher scores. **C:** Arrhythmia inducibility as a function of the number of factors simultaneously present. Median values are displayed as thick bars. Note how scores build up as additional factors are progressively included, showing a positive and highly significant correlation. Of note, ventricular fibrillation was induced in the presence of only increased IVP in 3 normal hearts, which highlights the deleterious effect of increased IVP per se, even in the absence of other proarrhythmic factors. AA = acidified and adrenergic; JT = Jonckheere-Terpstra test (nonparametric); MVT = Monomorphic Ventricular Tachycardia; MWU = Mann-Whitney  $U$  test (nonparametric, nonpaired); SC = Spearman correlation (nonparametric); VE = Ventricular Ectopy; VF = ventricular fibrillation; VT = ventricular tachycardia; WSR = Wilcoxon signed rank test (nonparametric, paired).

milieu was not as overtly deleterious for the reentry substrate as the presence of HF-ER or increased IVP. It did not consistently change CV. We speculate that this lack of reproducibility might be explained by the dissimilar sensitivity of the various hearts to the 2 mechanisms potentially involved in our AA milieu: (1) enhanced function of  $\text{Na}^+$  channels due to norepinephrine, which would yield an increased CV, and (2) lower availability of extracellular  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ , resulting in a depressed CV. Although this AA milieu reproducibly shortened APD, the lack of consistently promoting slower CV, shorter WL, and increased DoR explains our not significantly higher rate of induced sustained arrhythmias, as most of these should be initiated by reentry in this model. In the clinical setting, catecholamines may facilitate triggered activity based on afterdepolarizations caused by spontaneous release of calcium from the sarcoplasmic reticulum.<sup>2</sup> Indeed,  $\beta$ -blockers are effective in preventing ventricular tachyarrhythmias in CHF since spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  waves are suppressed by directly reducing the open duration of the cardiac ryanodine receptor.<sup>30</sup> This  $\beta$ -blocker-mediated reduction in the spontaneous abnormal ventricular activity, automaticity, and/or afterdepolarizations might limit the triggers for reentry in patients with CHF.

### Why was blebbistatin not used?

The electromechanical uncoupler blebbistatin was not used as it has been reported to significantly modify the effects of acute ventricular stretch,<sup>31</sup> so it would have confounded the

measurements obtained during increased IVP. Also, it has recently been reported to have significant electrophysiological effects.<sup>32</sup> Indeed, porcine stretch-induced atrial fibrillation instantaneously finishes when blebbistatin is added to the perfusion (David Filgueiras-Rama, MD, PhD, unpublished data, 2012). Thus, a combination of a gentle mechanical restraint and a validated method to obtain repolarization times in the presence of motion artifacts was used instead.<sup>15</sup>

### Study limitations

The rapid-pacing model mainly resembles HF derived from fast rates as in patients with tachycardiomyopathy and does not promote significant fibrosis.<sup>22</sup> Thus, our findings might not extrapolate to CHF stages or other HF etiologies. Nevertheless, the rapid-pacing model achieves neurohormonal alterations and degrees of LV dilation and pump dysfunction consistent with those found in patients with CHF.<sup>33</sup> Also, our model might be applied to acute decompensated HF episodes where hemodynamic worsening may promote ventricular arrhythmias by a stretch-related mechanism.

The isolated heart model cannot replicate every finding in patients with HF. For example, since our hearts are devoid of pericardium, they may be more prone to stretch than are intact hearts in the clinical situation where pericardium may prevent overdistension by providing only a limited amount of space for the hearts to expand into. To our knowledge, this limitation is shared by most previous studies on the

electrophysiological effects of stretch.<sup>4,5,9,11,12,28,29,31</sup> Also, the higher neuraxial centers that have a significant effect on HF are not present in this model. IVP was applied for short periods of time that does not reflect the chronically increased IVP experienced by patients with HF. Nevertheless, chronic stretch produces electrophysiological remodeling,<sup>3</sup> and its effects can be considered as included in the HF-ER generated during the rapid-pacing period ( $\sim 1$  month). Conversely, our aim was to evaluate the acute effects of an increased IVP, since recent data from patients with HF with an implanted hemodynamic monitor/implantable cardioverter-defibrillator indicated a preferential sensitivity of VT/VF events to acutely increased IVP rather than to a chronically increased IVP.<sup>6</sup> Also, a certain degree of caution is warranted in interpreting the obtained OR owing to the small sample size (56 measurements from 14 hearts in 4 conditions). Finally, most of the deleterious effects of CHF humoral changes, especially catecholamines, have been described as related to increases in abnormal automaticity and the promotion of afterdepolarizations,<sup>7</sup> and the present protocol was not designed to evaluate this. Thus, we could mainly quantify the relative weight of our AA milieu in promoting a substrate favoring reentry.

In spite of these limitations, the model used in the present study enabled us to evaluate the individual and combined contributions of 3 key factors involved in the substrate favoring reentry in HF in a heart whose size is similar to the human heart.

## Conclusion

Although completely different at the ionic and molecular levels, the effects of HF-ER and of acute increments in IVP have important similarities at the tissue level. Both contributed to favor reentry by decreasing CV and WL and by increasing DoR. Indeed, both factors similarly increased the odds of inducing sustained ventricular arrhythmias ( $> 6$ -fold) in this experimental model. These data, together with recent data from patients with CHF,<sup>6</sup> highlight the potentially important contribution of an increased IVP to SCD in HF.

## Appendix

### Supplementary data

Supplementary material cited in this article is available online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.hrthm.2015.05.017>.

## References

- Lane RE, Cowie MR, Chow AW. Prediction and prevention of sudden cardiac death in heart failure. *Heart* 2005;91:674–680.
- Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2004;61:208–217.
- Hussain W, Patel PM, Chowdhury RA, Cabo C, Ciaccio EJ, Lab MJ, Duffy HS, Wit AL, Peters NS. The renin-angiotensin system mediates the effects of stretch on conduction velocity, connexin43 expression, and redistribution in intact ventricle. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010;21:1276–1283.
- Reiter MJ, Landers M, Zetelaki Z, Kirchhof CJ, Allessie MA. Electrophysiological effects of acute dilatation in the isolated rabbit heart: cycle length-dependent effects on ventricular refractoriness and conduction velocity. *Circulation* 1997;96:4050–4056.
- Zabel M, Portnoy S, Franz MR. Effect of sustained load on dispersion of ventricular repolarization and conduction time in the isolated intact rabbit heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996;7:9–16.
- Reiter MJ, Stromberg KD, Whitman TA, Adamson PB, Benditt DG, Gold MR. Influence of intracardiac pressure on spontaneous ventricular arrhythmias in patients with systolic heart failure: insights from the REDUCEhf trial. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;6:272–278.
- Vermeulen JT, McGuire MA, Ophof T, Coronel R, de Bakker JM, Kloppe C, Janse MJ. Triggered activity and automaticity in ventricular trabeculae of failing human and rabbit hearts. *Cardiovasc Res* 1994;28:1547–1554.
- Bardy GH, Lee KL, Mark DB, et al. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med* 2005;352:225–237.
- Moreno J, Zaitsev AV, Warren M, Berenfeld O, Kalifa J, Lucca E, Mironov S, Guha P, Jalife J. Effect of remodelling, stretch and ischaemia on ventricular fibrillation frequency and dynamics in a heart failure model. *Cardiovasc Res* 2005;65:158–166.
- Quintanilla JG, Moreno J, Archondo T, Chin A, Pérez-Castellano N, Usandizaga E, García-Torrent MJ, Molina-Morúa R, González P, Rodríguez-Bobada C, Macaya C, Pérez-Villacastín J.  $K_{ATP}$  channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res* 2013;99:576–585.
- Burton FL, Cobbe SM. Effect of sustained stretch on dispersion of ventricular fibrillation intervals in normal rabbit hearts. *Cardiovasc Res* 1998;39:351–359.
- Sung D, Mills RW, Schettler J, Narayan SM, Omens JH, McCulloch AD. Ventricular filling slows epicardial conduction and increases action potential duration in an optical mapping study of the isolated rabbit heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;14:739–749.
- Laurita KR, Girouard SD, Akar FG, Rosenbaum DS. Modulated dispersion explains changes in arrhythmia vulnerability during premature stimulation of the heart. *Circulation* 1998;98:2774–2780.
- Glukhov AV, Fedorov VV, Kalish PW, Ravikumar VK, Lou Q, Janks D, Schuessler RB, Moazami N, Efimov IR. Conduction remodeling in human end-stage nonischemic left ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 2012;125:1835–1847.
- Efimov IR, Huang DT, Rendt JM, Salama G. Optical mapping of repolarization and refractoriness from intact hearts. *Circulation* 1994;90:1469–1480.
- Akar FG, Rosenbaum DS. Transmural electrophysiological heterogeneities underlying arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Res* 2003;93:638–645.
- Laurita KR, Girouard SD, Rosenbaum DS. Modulation of ventricular repolarization by a premature stimulus. *Circ Res* 1996;79:493–503.
- Harada M, Tsuji Y, Ishiguro YS, Takanari H, Okuno Y, Inden Y, Honjo H, Lee JK, Murohara T, Sakuma I, Kamiya K, Kodama I. Rate-dependent shortening of action potential duration increases ventricular vulnerability in failing rabbit heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300:H565–H573.
- Wiegerinck RF, van Veen TA, Belterman CN, Schumacher CA, Noorman M, de Bakker JM, Coronel R. Transmural dispersion of refractoriness and conduction velocity is associated with heterogeneously reduced connexin43 in a rabbit model of heart failure. *Heart Rhythm* 2008;5:1178–1185.
- Lacroix D, Gluais P, Marquie C, D'Honnin C, Adamantidis M, Bastide M. Repolarization abnormalities and their arrhythmogenic consequences in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2002;54:42–50.
- Watanabe T, Yamaki M, Yamauchi S, Minamihaba O, Miyashita T, Kubota I, Tomoike H. Regional prolongation of ARI and altered restitution properties cause ventricular arrhythmia in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H212–H218.
- Akar FG, Spragg DD, Tunin RS, Kass DA, Tomaselli GF. Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2004;95:717–725.
- Poelzing S, Rosenbaum DS. Altered connexin43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1762–H1770.
- Obeyssekere MN, Chan W, Stub D, Prabhu S, Teo EP, Toogood G, Mariani J, Broughton A, Kistler PM. Left ventricular ejection fraction and absence of ACE inhibitor/angiotensin II receptor blocker predicts appropriate defibrillator therapy in the primary prevention population. *Pacing Clin Electrophysiol* 2010;33:696–704.
- Wei J, Ni J, Huang D, Chen M, Yan S, Peng Y. The effect of aldosterone antagonists for ventricular arrhythmia: a meta-analysis. *Clin Cardiol* 2010;33:572–577.
- Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, Kappenberger L, Tavazzi L. Longer-term effects of cardiac resynchronization therapy on mortality in heart failure. *Eur Heart J* 2006;27:1928–1932.
- Stambler BS, Laurita KR, Shroff SC, Hoeker G, Martovitz NL. Aldosterone blockade attenuates development of an electrophysiological substrate associated



- with ventricular tachyarrhythmias in heart failure. *Heart Rhythm* 2009;6:776–783.
28. Calkins H, Maughan WL, Kass DA, Sagawa K, Levine JH. Electrophysiological effect of volume load in isolated canine hearts. *Am J Physiol* 1989;256:H1697–H1706.
  29. Mills RW, Narayan SM, McCulloch AD. Mechanisms of conduction slowing during myocardial stretch by ventricular volume loading in the rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1270–H1278.
  30. Zhou Q, Xiao J, Jiang D, et al. Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Nat Med* 2011;17:1003–1009.
  31. Brines L, Such-Miquel L, Gallego D, Trapero I, Del Canto I, Zarzoso M, Soler C, Pelechano F, Cánoves J, Alberola A, Such L, Chorro FJ. Modifications of mechanoelectric feedback induced by 2,3-butanedione monoxime and blebbistatin in Langendorff-perfused rabbit hearts. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;206:29–41.
  32. Brack KE, Narang R, Winter J, Ng GA. The mechanical uncoupler blebbistatin is associated with significant electrophysiological effects in the isolated rabbit heart. *Exp Physiol* 2013;98:1009–1027.
  33. Dixon JA, Spinale FG. Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. *Circ Heart Fail* 2009;2:262–271.

### CLINICAL PERSPECTIVES

In recent data from patients with systolic heart failure (HF), the risk of ventricular tachycardia or ventricular fibrillation events for a particular patient was doubled on days when subject-specific pressures were acutely increased compared with their average pressure values. However, pressure thresholds unrelated to the specific state of the patient were not predictive of increased risk, which might indicate the existence of an adaption mechanism to chronically increased pressures.<sup>6</sup> In this porcine model of HF, the acute effect of increased intraventricular pressures seemed to be as deleterious as HF electrophysiological remodeling for the promotion of a substrate that favors reentry initiation and maintenance. Both factors similarly increased the odds of inducing sustained ventricular arrhythmias by >6-fold. All these findings together highlight the important contribution of increments in intraventricular pressure to sudden cardiac death in HF and might explain why patients with some HF etiologies mostly appear to benefit from implantable cardioverter-defibrillators when overt HF, and hence, increased intraventricular pressures, develop. Also, these data add to the understanding of why nontraditional antiarrhythmic therapies that, among other biochemical and neurohormonal properties, contribute to maintain adequate filling pressures (cardiac resynchronization therapy, angiotensin-converting enzyme inhibitors, aldosterone antagonists, etc), can decrease sudden cardiac death in HF. Thus, therapies able to prevent increments in intraventricular pressures or their electrophysiological effects might be postulated as potentially useful add-on antiarrhythmic strategies for preventing sudden cardiac death in patients with HF.

## ONLINE SUPPLEMENT

### EXPANDED METHODS

#### Ethical Approval and Anesthesia

The present study was conducted in accordance with National (RD 1201/2005) and European (2010/63/EU) guidelines for the care and use of laboratory animals. Approval was granted by the local committee on animal welfare. Pietrain pigs were used. Ketamine (20 mg/kg i.m.) was used for premedication. All surgical procedures were performed under general anesthesia first induced with propofol (6 mg/kg i.v.) until relaxation of extraocular muscles and loss of eyelid reflex. Then, atracurium besylate (0.2 mg/kg i.v.) was injected and intubation was performed. Anesthesia was maintained with isoflurane (2%) and atracurium besylate (1.25 mg/kg/h i.v.). Fentanyl (0.005 mg/kg/h i.v.) was used for analgesia. Mechanical ventilation was used during the whole procedure. ECG, expired CO<sub>2</sub> and pulse oximetry were used to control the depth and adequacy of anesthesia. Rectal temperature was monitored to prevent malignant hyperthermia.

#### HF-ER Model (Tachycardiomyopathy)

High-rate pacemakers (St. Jude Medical) and percutaneous right ventricular pacing leads were implanted in 10 Pietrain pigs (35–45 kg). After 24h, pacemakers were activated, and pacing was maintained at 190 beats/min. Animals were examined on a daily basis and their pulse monitored to assure 1:1 capture. When clear and sustained signs of HF (tachypnea, inability to stand up, anorexia, cyanosis and/or lethargy) developed (usually within the first 3-5 weeks), the explant surgery was programmed for the next day. Transthoracic echocardiographic evaluations were performed twice under general anesthesia: immediately before pacemaker implantation and 10 min after deactivating the pacemaker immediately before explanting the heart. Cross-sectional left ventricular (LV) thickness and internal dimensions were obtained at the level of the papillary muscles. Ejection fraction (EF) was estimated with the use of planimetry of LV end-systolic and end-diastolic areas in the cross-sectional view.<sup>1</sup> Although we had previously performed a similar HF-induction protocol in sheep with extremely low mortality,<sup>1</sup> three pigs suddenly died before developing clear signs of HF in the present protocol. In our previous study,<sup>1</sup> sham-operated animals did not show any difference with not-implanted animals, therefore 7 pigs, whose ages matched those in HF-ER group after the tachycardiomyopathy induction protocol, did not undergo pacemaker implantation and were used as controls.

#### Isolated Heart Preparation and Experimental Protocol

Once pigs were anaesthetized, hearts from both groups (HF-ER and controls) were exposed, excised, cooled, and rapidly connected to a Langendorff apparatus to be perfused and superfused with warm Tyrode's solution (37°C), under controlled perfusion pressure.<sup>1,2</sup> When the heart reached a temperature of 37°C, it was defibrillated to sinus rhythm. Testing for actual

Tyrode's pH, ionic and oxygen status was performed by direct sampling from a Langendorff side port during the experiment.

Arrhythmia inducibility was assessed and optical recordings were performed (as described below) under low and high left ventricle intraventricular pressure (IVP), alternating a normal Tyrode's solution and a CHF surrogate Tyrode's (acidified and adrenergic, AA-milieu). The latter was a modified Tyrode's solution with lower levels of  $\text{Na}^+$  (110 Vs. 130 mM),  $\text{K}^+$  (3 Vs. 4 mM) and  $\text{Mg}^{2+}$  (0.4 Vs. 1 mM) as compared to normal Tyrode's.<sup>3</sup> The AA-milieu modification has been previously described, aiming to approximate the core ionic changes found in patients with chronic HF treated with non-potassium-sparing diuretics.<sup>3</sup> The AA-milieu also included noradrenaline in a progressive concentration to achieve a final target heart rate of ~100 bpm before initiating the stimulation protocol. We decided to homogenize the catecholamine effect on all the studied hearts by adding norepinephrine until a prespecified heart rate of 100 bpm was achieved. We chose 100 bpm since resting heart rate in patients in overt HF tend to oscillate around that value when not treated with betablockers. To reach this heart rate, norepinephrine mean final concentration in the perfusion solution was  $0.79 \pm 0.18 \mu\text{M}$ . This perfusion might not fully mimic a CHF serum; however, the perfusion of the isolated heart with its own blood would also have significant limitations since 1) it would have been collected in a fully anesthetized animal with a significant decrease in the levels of catecholamines, as compared with its baseline HF situation and 2) these animals were not treated with diuretics, so no significant ionic imbalance would be found in their blood.

Similarly to previous studies,<sup>4-9</sup> the increased IVP was obtained by means of a fluid-filled balloon introduced into the LV to raise the end-diastolic pressure from ~0 mm Hg (low IVP) to ~20 mmHg (high IVP). Volume-conducted ECG, perfusion pressure and IVP were digitally monitored (Prucka Cardiolab, General Electric). Precautions were taken so that perfusion pressure was always higher than IVP pressure, in order to prevent subendocardial ischemia. Initial type of Tyrode's perfusion was randomized and the low or high IVP acquisition order was arbitrarily varied at both normal and CHF perfusions.

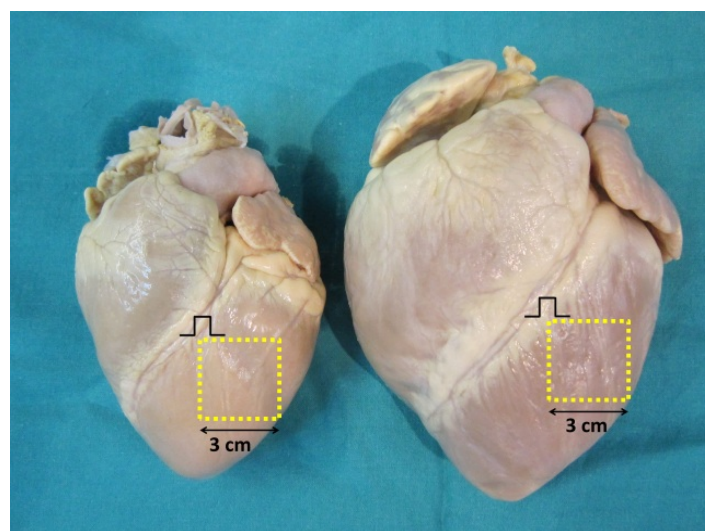
We elected not to use electromechanical uncouplers for several reasons. It is well known that electromechanical uncouplers such as 2,3-butanedione monoxime (BDM) or cytochalasin D alter action potential morphology and/or CV, and both were found to affect the vulnerability to ventricular arrhythmias.<sup>10</sup> Blebbistatin was initially reported to be free from these effects,<sup>11</sup> although controversy has recently arisen.<sup>12</sup> Additionally, it can precipitate into the microvasculature.<sup>13</sup> Yet, more importantly for the present study, blebbistatin significantly reduces the effects of ventricular stretch,<sup>14</sup> which would confound the measurements obtained during increased IVP. Another fact suggesting that blebbistatin significantly modifies the electrophysiological effects of chamber dilatation in pigs is that porcine stretch-induced AF instantaneously finishes when blebbistatin is added to the perfusion (David Filgueiras-Rama,

*unpublished observation*). Thus, we did not use any electromechanical uncoupler and relied on a mechanical approach to reduce motion by gently compressing the heart against the inner surface of the imaging windows of the superfusion chamber only for the time needed to record the set of movies at each setting.<sup>1, 2, 15-17</sup> We continuously monitored the perfusion pressure changes to ensure this gentle compression did not produce cardiac ischemia or enhance the vulnerability to arrhythmias.<sup>17</sup>

### ECG and Optical Recordings. Ventricular Stimulation Protocol

Prior to performing PES in each setting of the protocol, QRS duration and QTc interval were measured in sinus rhythm to evaluate any net effect on global ventricular depolarization and repolarization at the 4 different combinations of Tyrode's and IVP (low IVP + normal milieu, high IVP + normal milieu, low IVP + AA-milieu and high IVP + AA-milieu). As shown in **Supplementary Figure S1**, after focusing the field of view (squared field, side: 3 to 4 cm) on the anterior aspect of the LV, ventricular pacing was performed close to the left upper margin of the filmed area, using 0.5 mm-thick silver wires fixed to the subepicardium.

Instead of placing the pacing wire at the center of the field of view, we placed it outside to prevent quasi-simultaneous activation of a significant fraction of the filmed area due to local capture. The stimulation protocol included pacing at 500 ms and 300 ms basic drive cycle length (BDCL) adding one extrastimulus (S2). After determining the effective refractory periods (ERP) at 500 and 300ms, we recorded S1 and S2 (ERP+10ms) epicardial wavefronts, filming the local emitted fluorescence by Di-4-ANEPPS<sup>1, 2</sup> at 800 fps. Optical mapping recordings were performed at least 5 minutes after change of perfusion to allow steady state conditions to be reached. In one HF-ER heart, optical mapping was not performed due to unsolvable technical problems at the time of the experiment.



**Supplementary Figure S1.** Optical mapping field of view ( $\sim 3 \times 3 \text{ cm}^2$ ) and stimulation point in a control heart (left) and a HF-ER heart (right) after the tachycardiomyopathy induction protocol.

## Optical Data Processing and Analysis

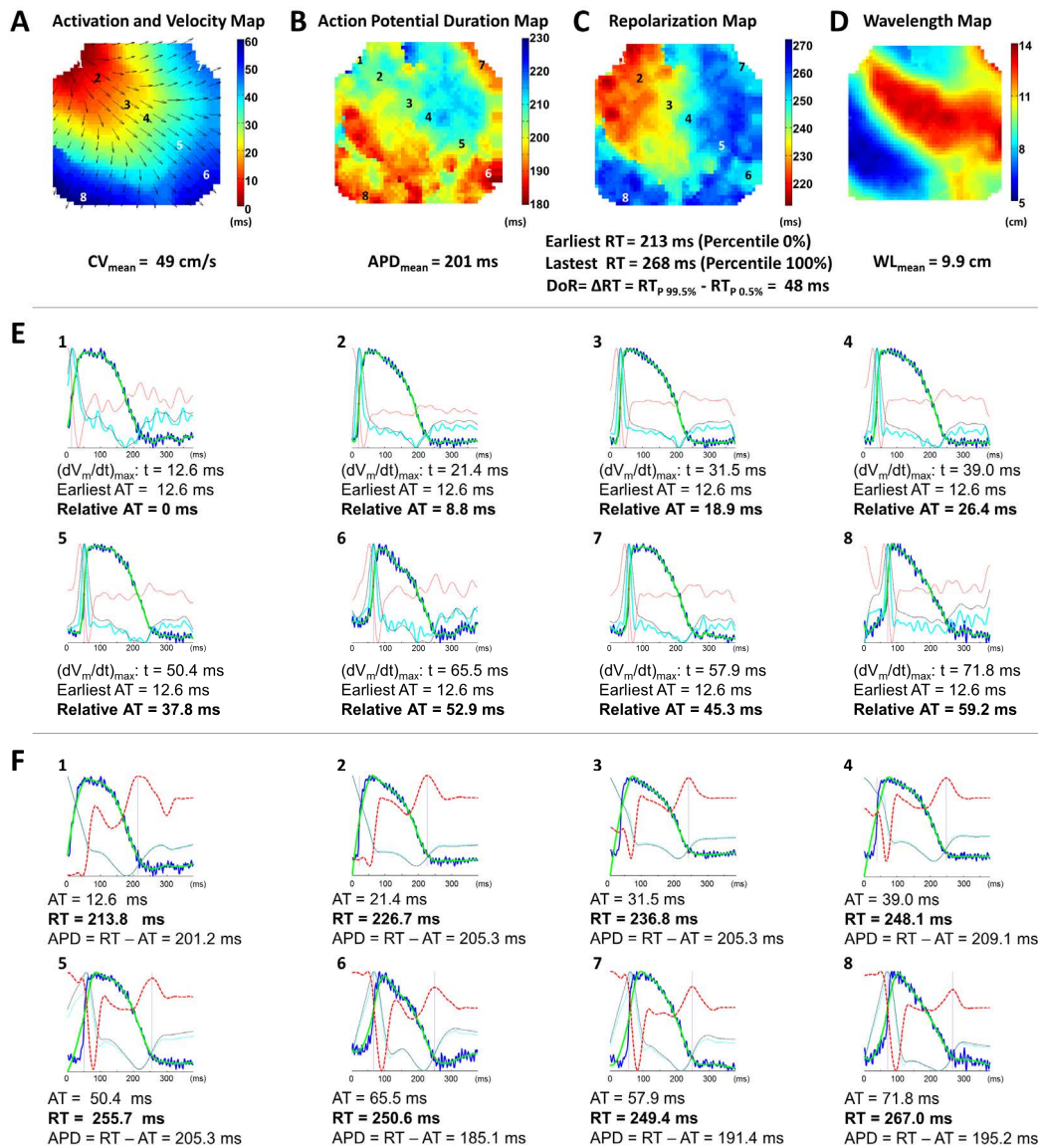
Prior to any analysis and regardless of the filmed area, movies were masked to always analyze a  $3 \times 3 \text{ cm}^2$  area (which was the area filmed in most experiments) in order to ensure that measurements of dispersion were comparable in all the hearts studied (dispersion of repolarization, DoR) and to diminish the effects of three-dimensional propagation, potentially more important at points located far from the subepicardially-inserted pacing wire. Optical mapping data were processed and analyzed using custom-made software. The activation and repolarization dynamics of S1 and S2 waves were analyzed. These results were routinely averaged from 3 different movies with the same cycle length and/or coupling interval under the same conditions: 3 S1 and 3 S2 waves for each one of the two BDCL (500 and 300 ms), for the 4 different combinations of IVP and milieu in 13 hearts. In some particular settings and hearts, it was not possible to register the 3 movies since a sustained arrhythmia requiring an electrical shock was induced before completion (see “Induced Arrhythmias” below). In such cases, all the available S2 beats (1 or 2) in that particular setting (level of IVP, type of milieu and pacing BDCL) and heart were analyzed and their measurements averaged. In addition, 3 S1 beats were obtained and analyzed, and their results averaged from the 1 or 2 available movies at that particular setting and heart. Such a protocol resulted in more than 600 waves analyzed to obtain the optical mapping data in **Figures 3-7** and **Supplementary Figures S6-S9**.

### Activation Times

Raw movies were pre-conditioned with a cone-shaped kernel time (3-frames) and spatial ( $3 \times 3$  pixels) filtering.<sup>1, 2, 18</sup> Then, and only for the analysis of activation times and velocities, a 50<sup>th</sup> order low-pass Butterworth filter (zero-phased to prevent undesired delays in the filter output) was applied to further improve the detection of activation times.<sup>19, 20</sup> Areas with poor signal-to-noise ratios were masked. Activation time of each pixel was calculated at the time of  $(dV/dt)_{\max}$  in the fluorescence signal, as shown in **Supplementary Figure S2E**. Then, activation maps including activation times relative to the point of earliest activation on the field of view were computed.

### Conduction Velocity

Local velocity vectors, representing the magnitude and direction of conduction velocity at each recording site, were computed essentially as previously described.<sup>21</sup> Briefly, to avoid overestimation of velocities due to similar activation times in adjacent pixels acquired with a high resolution CCD camera, the matrix containing activation times was downsampled by 4. Then, the resulting activation times were fitted with a cubic smoothing spline surface resulting in a scalar field that described local activation times as a function of position. Assuming that propagation is normal to the wavefront at each point, through the gradient of this function we can obtain a vector field with the local conduction velocity (CV) at each location.<sup>21</sup> Before averaging, the residual spurious values of CV caused by simultaneous capture of tissue adjacent to the site of pacing (virtual electrode) were discarded and excluded from analysis.



**Supplementary Figure S2.** Example of the optical mapping measurements performed. **A.** Activation and Velocity map. **B.** Action Potential Duration (APD) map. **C.** Repolarization map. **D.** Wavelength map. **E.** Example of detection of activation times at the time of  $(dV_m/dt)_{\text{max}}$  at 8 points (1-8) in the field of view. The blue tracings display the preconditioned optical action potentials. The green tracings display these optical action potentials after low-pass Butterworth filtering. The first derivative is performed over these filtered potentials (cyan tracings), showing a clear and unique absolute maximum at the time of activation. Although this filtering is suitable to detect activation times, it is not suitable for detecting repolarization times at the time of  $(d^2V/dt^2)_{\text{max}}$  since too much noise is still present outside the upstroke interval in the first derivative, even after additional filtering (black tracings). Thus, multiple maxima would be found in the second derivative (red tracings) preventing the accurate detection of repolarization times. **F.** Example of detection of repolarization times at the time of  $(d^2V/dt^2)_{\text{max}}$ . The blue and green tracings represent the preconditioned and the smoothed optical signals, respectively. Instead after low-pass Butterworth filtering as in E, green tracings were obtained with local regression using weighted linear least squares and a 2<sup>nd</sup> degree polynomial model, order 100. These green smoothed tracings tracked faithfully the optical action potential outside the upstroke interval while avoiding small fluctuations due to noise. Cyan tracings display the first derivative of the green smoothed potentials. These were filtered again by a zero-phased, 23 ms boxcar filter as originally described<sup>22</sup> yielding the black tracings. A new

derivative was then performed over these black tracings to obtain the red tracings (second derivative), whose maximum value marks the end of the local repolarization.<sup>22</sup> AT: activation time; RT: repolarization time.

Then, we measured the averaged CV magnitude ( $CV_{\text{mean}}$ ) in the whole field of view. Of note, the size of the displayed vectors in the figures is automatically adjusted in order to prevent vectors from overlapping. Therefore, their sizes are not comparable among different maps from different wavefronts.

### **Repolarization Times and Action Potential Duration**

As mentioned above, several precautions were taken to minimize motion artifacts. Nevertheless, some residual motion artifact was present in some movies of some hearts or settings. Therefore, to address this issue, instead of using the typical approach to measure repolarization times (time at which the optical action potential returns to 80 or 90% of the fully repolarized level of fluorescence), we used a validated method,<sup>22</sup> which has been extensively used previously to obtain repolarization times at the time of  $(d^2V/dt^2)_{\text{max}}$  from optical mapping data in the absence of electromechanical uncouplers.<sup>15, 16, 22-24</sup> This method was demonstrated to provide accurate repolarization times even in the presence of substantial levels of motion artifact.<sup>22, 24</sup> Thus, although our approach is not without limitations, we believe that we chose the best currently-available option since the other potential approaches would have been more limiting to achieve the objectives of this study, as discussed above.

The method described was applied in the original work by Efimov *et al.*<sup>22</sup> to optical signals obtained from a photodiode array. This type of optical mapping system has a lower spatial resolution but considerably better signal-to-noise ratios than those obtained with CCD cameras. Thus, we modified this method by using a seemingly more aggressive initial filtering of the optical action potentials than that used in the original study. Thus, instead of using an 8-ms boxcar filter, we smoothed the optical action potentials with local regression using weighted linear least squares and a 2<sup>nd</sup> degree polynomial model, order 100. Several examples are shown in **Supplementary Figure S2F**. Blue tracings display the preconditioned optical action potentials and green tracings are their smoothed versions.

As can be noted, the green smoothed version faithfully tracked the optical action potential during the repolarization phases while avoiding the small fluctuations due to noise. These small fluctuations are extremely deleterious for reliable implementation of the  $(d^2V/dt^2)_{\text{max}}$  method since they generate spurious fluctuations on the subsequent derivatives that have to be performed later as shown in **Supplementary Figure S2E**. The only disadvantage of this smoothing method is that it does not fit well with the rapid transitions during the upstroke of the action potential. This is the reason why a Butterworth FIR filter was used instead of this smoothing approach to detect activation times, as described above. However, since the current approach was not used to detect activation but repolarization times and the adjustment between the preconditioned and smoothed

potentials during the repolarization phases was excellent, this issue did not constitute a problem, as shown in **Supplementary Figure S2F**.

Once the optical action potentials were smoothened, the first derivative was performed over these smooth potentials. This first derivative was then filtered with a 23 ms boxcar filter, as used in the original reference<sup>22</sup> which prevents the appearance of spurious maxima when the second derivative (red tracing) is performed. It was a zero-phased filter to prevent any temporal delay in the filter output. Then, repolarization times were obtained at the time of  $(d^2V/dt^2)_{\max}$ .<sup>22</sup> It is important to note that in S1 waves, the upstroke of the following wave (S1 or S2) also produces a local maximum on the second derivative (some examples are shown in **Supplementary Figure S5**). If the following wave is an S2, the local maximum produced by the upstroke of the following S2 wave and the one produced by the repolarization of the analyzed beat (the one of interest) fuse together, preventing the algorithm from obtaining reliable repolarization times. For this reason, we did not use the last S1 wave prior to S2, but the previous one, to obtain repolarization parameters in S1 beats.

In the few cases in which two maxima of similar amplitude were found in a plausible repolarization window, our algorithm selected the one that minimized the global dispersion of repolarization. Thus, our measurements of dispersion of repolarization (DoR) are conservative, as we did not want to overestimate DoR due to unreliable detection of a few repolarization times. Repolarization maps were generated using the detected repolarization time at each unmasked pixel. Residual pixels with unreliable repolarization times not consistent with their neighbouring pixels were also masked to not artificially increase the measured DoR values.

Despite the precautions described, the absolute difference in repolarization times ( $RT_{\max} - RT_{\min}$ ) is prone to overestimate DoR due to individual pixels with outlier values; consequently, we used the difference between 0.5% and 99.5% percentiles of the repolarization times, i.e.  $DoR = RT_{P99.5\%} - RT_{P0.5\%}$ , to quantify DoR (**Supplementary Figure S2C**). This approach does not take into account the 1% of more extreme repolarization times. Thus, for example, in a completely unmasked field of view (64x64 pixels = 4096 pixels), the 20 pixels with the lower values and the 20 pixels with the highest values would not be considered to estimate DoR.

Optical action potential duration (APD) at each unmasked pixel was calculated as the difference between repolarization and activation times when both were reliable. These APD values were displayed as spatial maps. The averaged value ( $APD_{\text{mean}}$ ) was obtained from each wave analyzed.

In spite of the method used and the precautions taken, 2 control and 1 HF-ER hearts exhibited excessive motion artifacts to offer reliable repolarization data. Therefore, these 3 hearts were excluded from the repolarization analysis but were actually included in the activation



analysis, as motion artifact starts when the upstroke of the optical action potential has already ended, so motion artifact does not significantly affect activation measurements. For this reason, activation data was obtained from 13 hearts (7 control, 6 HF-ER), while repolarization data was only retrieved from the 10 hearts that offered reliable repolarization times (5 control, 5 HF-ER).

### **Wavelength**

Wavelength maps were computed as the product of the local CV magnitude and the local APD. The local value of wavelength gives an image of the distance between the depolarizing wavefront and the repolarizing tail at each region. An averaged value of the wavelengths in the whole unmasked filmed area was obtained ( $WL_{\text{mean}}$ ).

### **Induced Arrhythmias**

Once the effective refractory period (ERP) had been determined for each setting, ventricular arrhythmia inducibility was determined analyzing all provoked ventricular arrhythmias on the ECG after 5-6 drive trains (S1S1) of 8 beats followed by an extrastimulus (S2) at ERP+10ms, at two BDCL (500 ms and 300 ms) and at the 4 combinations of factors tested (high/low IVP and N-Ty/CHF-Ty). If a sustained VT or VF was induced, requiring a shock to be terminated, the protocol at that configuration was halted and the next setting was evaluated at least 5 minutes later when steady state conditions had been attained. If a sustained arrhythmia ended using short bursts of epicardial overdrive pacing, the protocol continued to complete the 6 attempts of induction or until a shock was required. Such a protocol resulted in 557 effective attempts to induce arrhythmias in the 14 hearts.

To quantify arrhythmia inducibility, induced ventricular arrhythmias were scored as follows: VF (8 points), sustained VT that changed to VF (7), sustained monomorphic VT (6), non-sustained polymorphic VT (5), non-sustained monomorphic VT (4), run of 3 ventricular ectopies (triplet, 3), two ventricular ectopies (doublet, 2), a single elicited ventricular ectopy (1) and no induced arrhythmia (0 points). For each heart, BDCL and setting, a median and a maximum score were obtained. We defined the worst arrhythmia (WA) value as the maximum score elicited at each BDCL and setting. Of note, we scored both arrhythmias elicited after S2 and during S1 train, since the mechanisms underlying both at high pacing rates are likely similar.

### **Statistical Analysis**

The Shapiro-Wilk test was used to test continuous variables for normality. Echocardiographic parameters (**Supplementary Table S1**) were compared with a paired t-test. The independence assumption prohibits application of generalized linear models to correlated data. Generalized Estimating Equations (GEE) were developed to extend generalized linear models to accommodate correlated data. As described elsewhere,<sup>25</sup> GEE approaches have become increasingly important and widely used in analyzing such data as a general and flexible method for correlated discrete data. An attractive property of GEE is that one can use a

misspecified working correlation matrix and yet the regression coefficient estimator is still consistent and asymptotically normal. The covariance matrix of the estimated regression coefficients can be also consistently estimated using the so called robust or sandwich estimator.<sup>25</sup> The only model assumptions are that cases are assumed to be dependent within subjects and independent between subjects. The correlation matrix that represents the within-subject dependencies is estimated as part of the model. Thus, a mixed model with GEE was used to test for significant differences and interactions in data in **Figures 3-6**, using subject identifier as the “subject” factor, remodeling (control or HF-ER heart) as a “between-subjects” factor and up to 4 “within-subjects” factors (repeated measures): IVP (low or high), type of milieu (normal or AA), BDCL (500 or 300 ms) and type of beat (S1 or S2), when applicable. GEE were also used to obtain the odds ratios quantifying the propensity for each factor (remodeling, IVP, milieu) to favor the induction of sustained arrhythmias. Unlike conventional logistic regression that uses the assumption of independent cases, the method used here (GEE) takes into account that cases are correlated (several measurements under different settings within each heart) which yields more reliable OR estimations.

Data in **Supplementary Table S2** was tested for significance with Fisher’s exact test and Mann-Whitney’s U test (non-paired) for categorical and continuous variables respectively. Also, odds ratios were obtained for categorical variables. Maximum (worst arrhythmia, **Figure 8**) and median score values (**Supplementary Figure S10**) were compared between control and HF-ER groups with a non-parametric Mann-Whitney U test (non-paired) and within hearts in each group by Wilcoxon’s signed ranks test (paired). Spearman’s correlation and the non-parametric Jonckheere-Terpstra test were used to test the increasing arrhythmia inducibility with the number of proarrhythmic factors.

Continuous variables are typically expressed as mean±SEM except in **Supplementary Table S2**, as these data did not follow a normal distribution and were expressed as median and interquartile range, i.e. median [P<sub>25%</sub>-P<sub>75%</sub>]. In **Figure 8**, the arrhythmic scores are also displayed as median and interquartile range, i.e. median [P<sub>25%</sub>-P<sub>75%</sub>]. Accordingly, non-parametric tests were used with this data as mentioned above. A two-tailed p<0.05 was considered statistically significant.

## SUPPLEMENTARY RESULTS (DISCUSSED)

### HF-ER Induction and Echocardiographic Findings

In the HF-ER group, rapid ventricular pacing induced significant overt dilatation and contractile dysfunction (**Supplementary Table S1**).

**Supplementary Table S1. Echocardiographic data before and after HF induction protocol (N=7)**

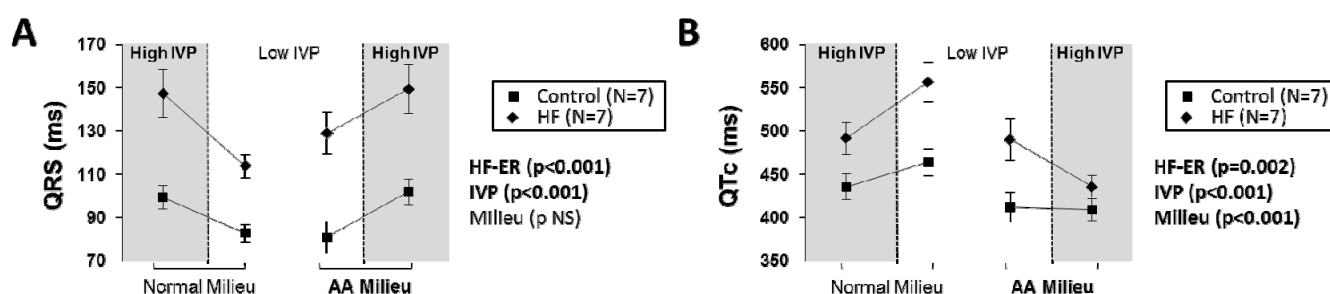
	Pre	Post	p value
LV end-diastolic diameter (cm)	3.9±0.2	5.0±0.2	0.03
LV end-systolic diameter (cm)	2.4±0.2	4.0±0.2	<0.001
LV end-diastolic area (cm <sup>2</sup> )	12.6±1.1	20.2±1.7	0.01
LV end-systolic area (cm <sup>2</sup> )	4.4±0.5	14.4±1.5	<0.001
LV ejection fraction (%)	65±4	24±2	<0.001
RV end-diastolic diameter (cm)	1.8±0.2	2.8±0.3	0.04
RV end-diastolic area (cm <sup>2</sup> )	7.5±1.1	15.8±1.4	0.002
LA Area (cm <sup>2</sup> )	8.2±0.4	21.4±3.1	0.01
RA Area (cm <sup>2</sup> )	8.7±0.8	19.10±2.3	0.002

Values are expressed as mean±SEM. A paired t-test was used.

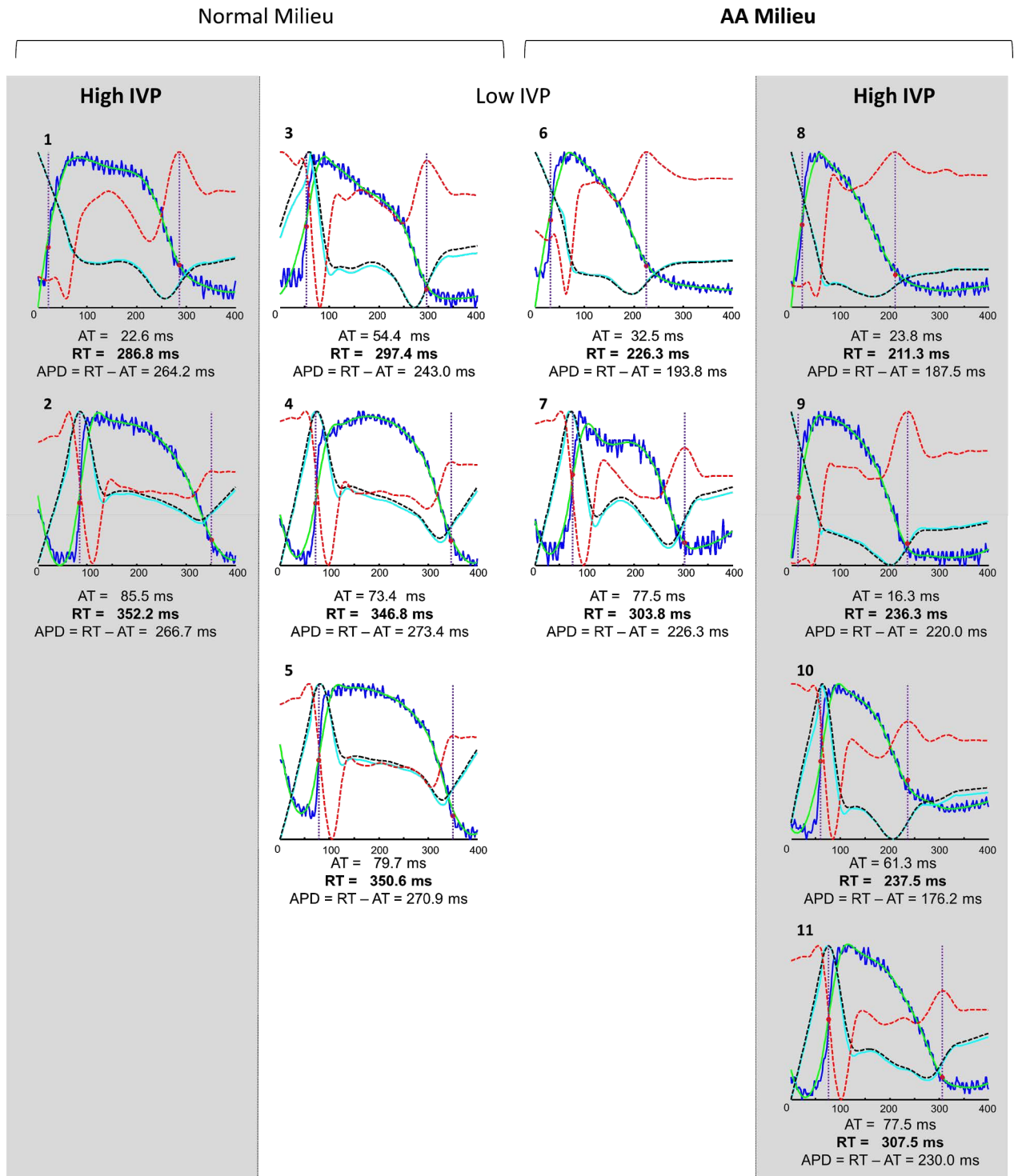
LV, left ventricular; RV, right ventricular; LA, left atrial; RA, right atrial.

### Volume-conducted ECG in Sinus Rhythm

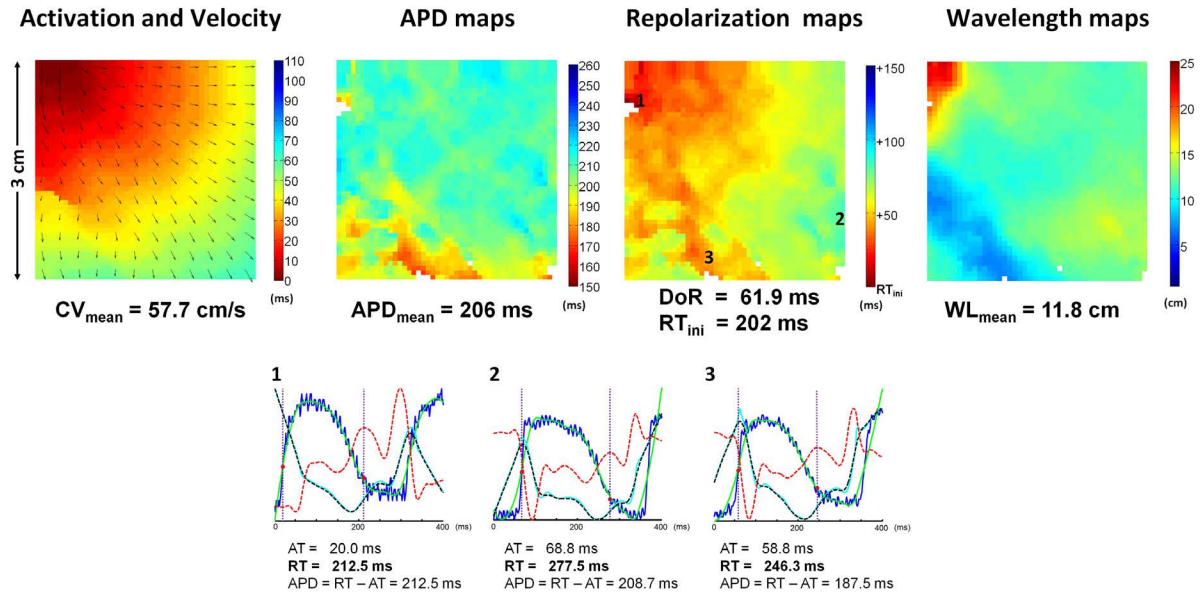
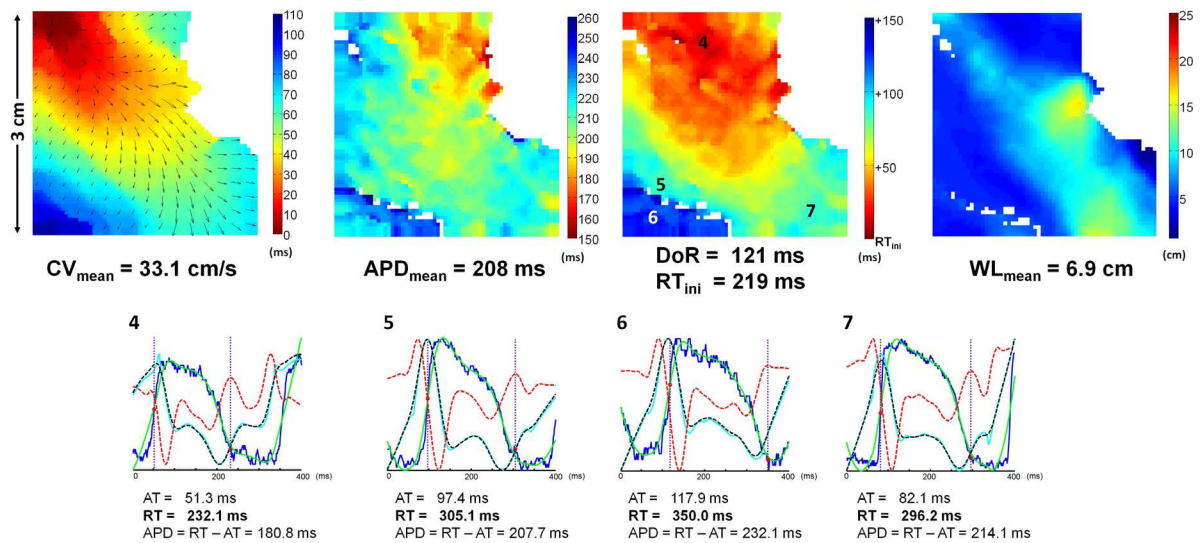
QRS (**Supplementary Figure S3A**) was consistently wider in the HF-ER group (all settings average increase: +48%,  $p<0.001$ ) and under increased IVP (+22%,  $p<0.001$ ). The presence of the AA-milieu did not significantly modify the QRS duration. QTc (**Supplementary Figure S3B**) was longer in HF-ER hearts (+15%;  $p=0.002$ ) and shorter under high IVP (-8%;  $p<0.001$ ) and the AA-milieu (-10%;  $p<0.001$ ).



**Supplementary Figure S3.** Volume-conducted ECG. Data are displayed as mean±SEM. **A.** QRS in sinus rhythm. **B.** Corrected QT (QTc) in sinus rhythm.



**Supplementary Figure S4.** Example of optical action potentials at the selected pixels from the repolarization maps in Figure 1. In this example, DoR was increased by the AA-milieu and by high IVP. Note the increased global (8 and 11) and local DoR (10 and 11 at both sides of a potential line of block) under AA-milieu and increased IVP. **AT:** activation time. **RT:** repolarization time. **APD:** Action Potential Duration. **Blue tracings:** optical action potentials. **Green tracings:** smoothed version of the optical action potentials. **Cyan tracings:** first derivative of the green tracings. **Black tracings:** filtered first derivative (filtered version of the cyan tracings). **Red tracings:** second derivative (derivative of the black tracings). The maximum of the red tracings marks the local repolarization time. The time interval between the 2 vertical lines (activation and repolarization times) is the APD.

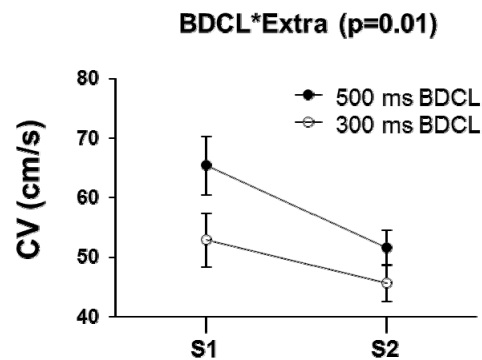
**A****Control heart (300-S1)****B****HF-ER heart (300-S1)**

**Supplementary Figure S5.** Example of activation/velocity, APD, repolarization and wavelength maps in a control **(A)** and a HF-ER heart **(B)** (S1 beat, 300 ms BDCL, normal milieu, low IVP). Note the reduced CV and wavelength and the increased epicardial DoR in the HF-ER heart. Optical Action Potentials at the pixels marked with numbers are shown (color tracings and abbreviations as in **Supplementary Figure S4**).

## Optical Mapping Measurements: Interactions

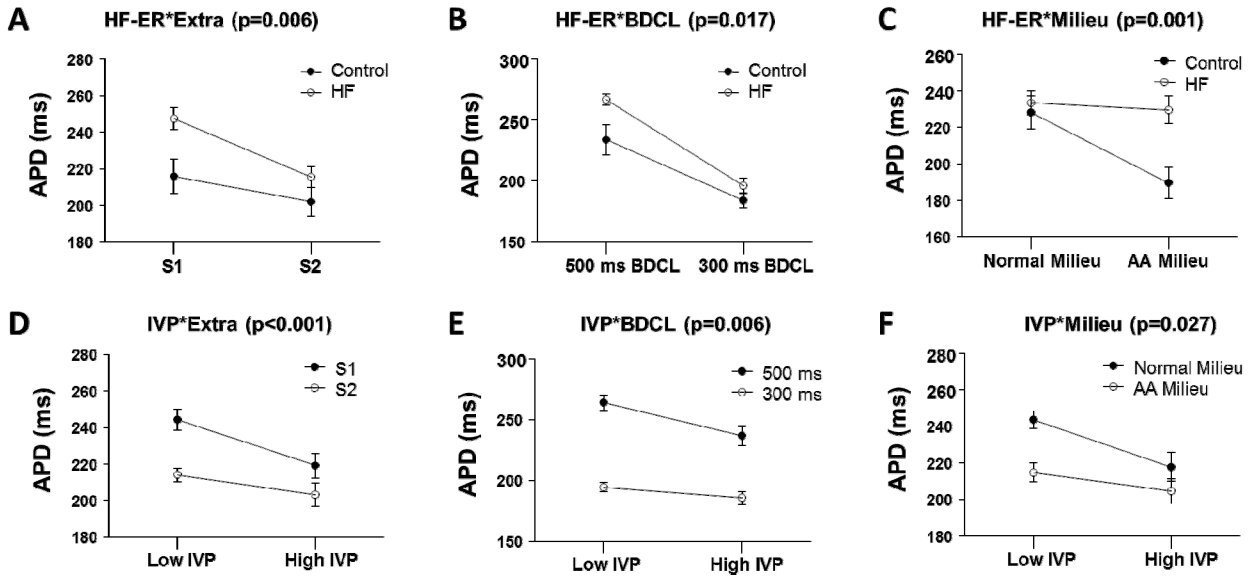
The main effects of the independent factors involved in the proarrhythmic substrate of the model have been described in the manuscript. Here, we show all 2-way interactions and comment on the most relevant ones. In the figures below, non-parallel lines usually indicate an interaction effect.

As an example, **Supplementary Figure S6** shows the significant BDCL\*Extra interaction found in CV, as suggested by the different slopes of the 2 lines displayed. This indicates that the extrastimulus (S2) slowed propagation at both BDCL (500 and 300 ms), but this relative slowing was greater with 500 ms BDCL than with 300 ms BDCL (21% vs. 14%,  $p=0.01$ ). This might be explained since propagation of S1 beats pacing at 300 ms BDCL is slower *per se* than at 500 ms BDCL, so the effect of a premature stimulus (S2) on CV does not seem to be as important as with 500 ms BDCL, i.e. there is less room for CV decrease with S2 when pacing at 300 ms BDCL.



**Supplementary Figure S6.** Interactions found in Conduction Velocity. Data are displayed as mean $\pm$ SEM.

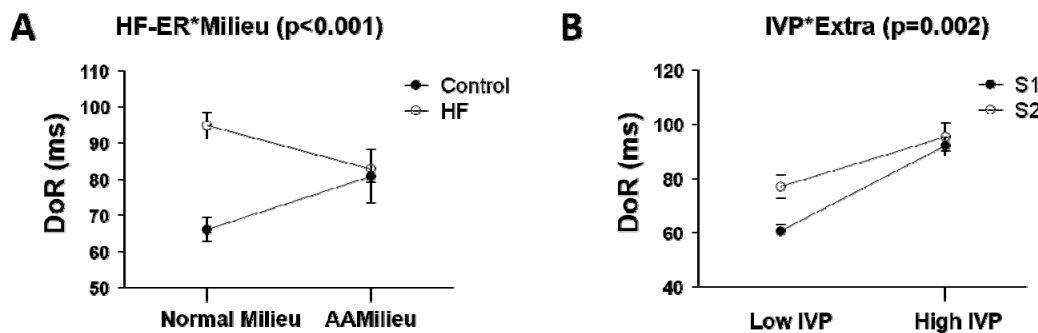
On average, APD was longer in HF-ER hearts (+11%,  $p=0.024$ , **Figure 3**), although this difference was less evident in S2 beats (Remodelling\*Extra interaction:  $p=0.006$ , **Supplementary Figure S7A**) or/and pacing at the shortest cycle (Remodelling\*BDCL interaction:  $p=0.017$ , **Supplementary Figure S7B**). Indeed, this difference in APD between control and HF-ER hearts was nonexistent pacing at 300 ms BDCL under the normal milieu (an example is shown in **Figure 2**). On average, as shown in **Figure 4**, APD was significantly shortened by high IVP (-8%,  $p<0.001$ ) and the CHF milieu (-9%,  $p<0.001$ ). Of note, HF-ER hearts appeared to be less prone to the APD shortening produced by the AA-milieu. This increased the difference in APD between control and HF-ER hearts in such conditions (Remodelling\*Milieu interaction:  $p=0.001$ , **Supplementary Figure S7C**).



**Supplementary Figure S7.** Interactions found in Action Potential Duration. Data are displayed as mean $\pm$ SEM.

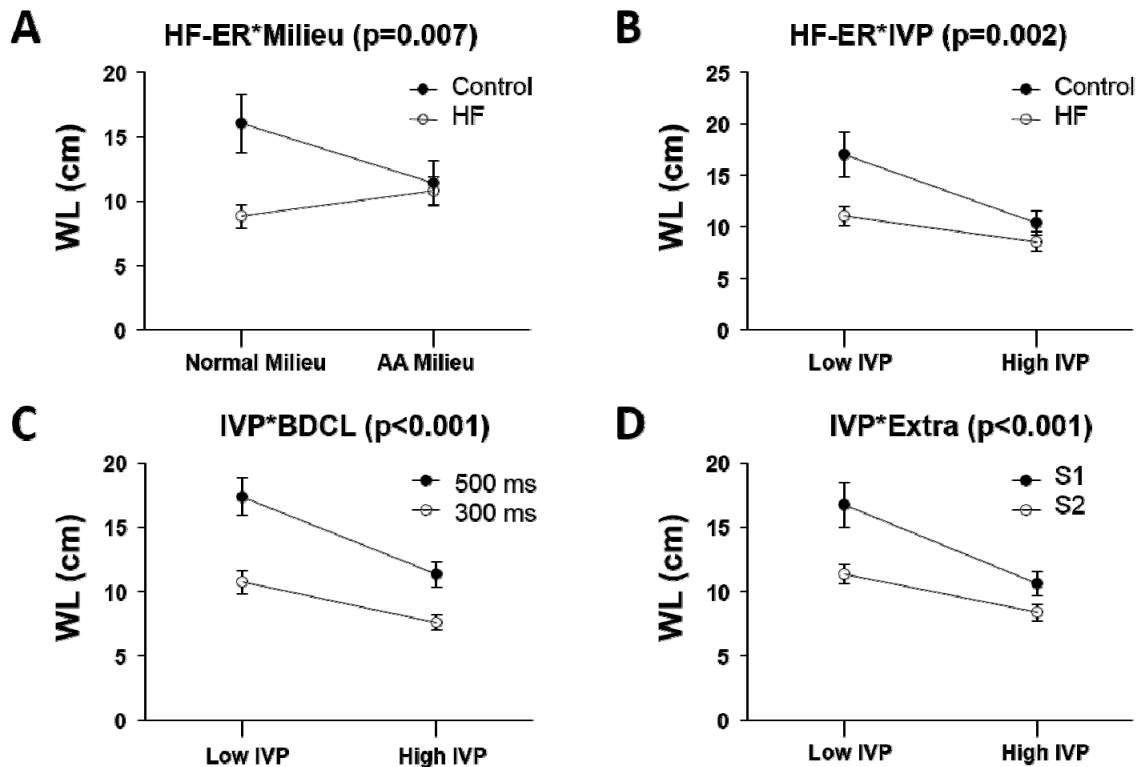
APD prolongation in failing hearts has previously been found to be rate-dependant,<sup>3, 26</sup> since APDs can actually be shorter in HF-remodeled hearts than in controls pacing at short BDCL [ $<400$  ms<sup>26</sup>,  $<350$  ms<sup>3</sup>]. Further, subepicardial APDs have been found to be similar in normal and cardiomyopathic human hearts pacing at 300 ms BDCL.<sup>20</sup> This is in agreement with our results, since the remarkable differences in APD between normal and HF-ER hearts pacing at 500 ms were not found at 300 ms BDCL with normal milieu.

The AA-milieu had opposite effects on DoR in control and HF-ER hearts (Remodelling\*Milieu interaction:  $p<0.001$ , **Supplementary Figure S8A**). Also, the increase in DoR after S2 was less evident with increased IVP (IVP\*Extra interaction:  $p=0.002$ , **Supplementary Figure S8B**). Of note, no significant 2-way Remodelling\*IVP interactions were found in CV, APD or DoR, suggesting that the effect of the increased IVP over these parameters is similar in normal and HF-ER hearts (decreased CV and APD, increased DoR).



**Supplementary Figure S8.** Interactions found in Dispersion of Repolarization. Data are displayed as mean $\pm$ SEM.

On average, the AA-milieu did not significantly shorten  $WL_{mean}$ ; however, it shortened WL in control hearts but not in HF-ER hearts (Remodelling\*Milieu interaction:  $p=0.007$ , **Supplementary Figure S9A**). This fact, together with the Remodelling\*Milieu interaction reported above, means that the AA-milieu might play a protective role in HF-ER hearts, at least for reentry ( $\downarrow DoR$ ,  $\uparrow WL$ ). Also, the WL shortening effect of increased IVP was more evident in control than in HF-ER hearts (Remodelling\*IVP interaction:  $p=0.002$ , **Supplementary Figure S9B**). This yielded less different wavelengths for control and HF-ER hearts in the presence of increased IVP.



**Supplementary Figure S9.** Interactions found in Wavelength. Data are displayed as mean $\pm$ SEM.

### Influence of BDCL on the Induced Arrhythmias

A total of 557 attempts to induce arrhythmias were performed in 14 hearts. Of note, only 8 sustained arrhythmias were elicited from a total of 302 attempts when pacing at 500 ms. Sustained arrhythmias were much more easily induced pacing at 300 ms and showed lower cycle lengths. However, neither the morphology of the elicited arrhythmias (monomorphic or polymorphic) nor their time of induction (during S1 train or after S2), were significantly influenced by BDCL. More details are provided in **Supplementary Table S2**.



**Supplementary Table S2. Induced Arrhythmias**

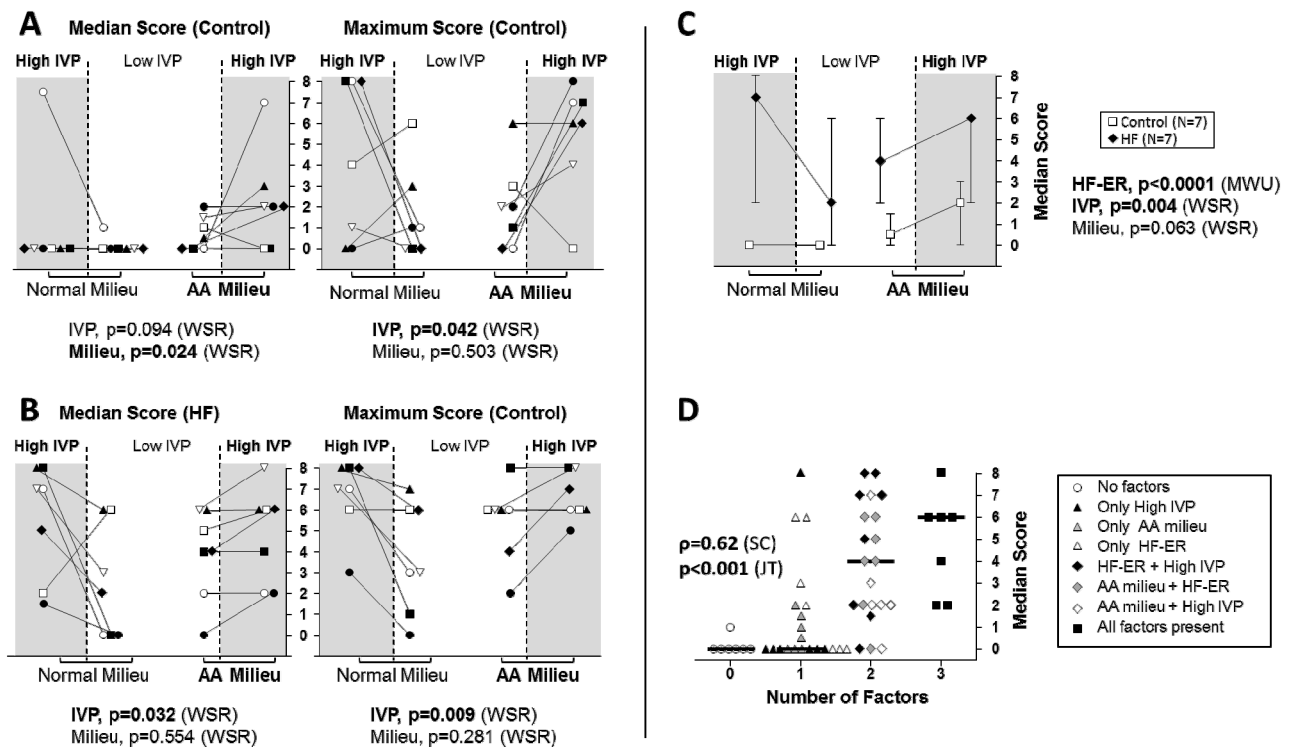
	Total		500 ms BDCL		300 ms BDCL		p value	OR (CI <sub>95%</sub> )
<b>No arrhythmia</b>	379	68.0%	232	76.8%	147	57.6%	<b>&lt;0.001</b>	<b>2.43 (1.69, 3.51)</b>
<b>Arrhythmia</b>	178	32.0%	70	23.2%	108	42.4%		
<i>Non Sustained</i>	130	73.0%	62	88.6%	68	63.0%	<b>&lt;0.001</b>	<b>4.56 (1.98, 10.49)</b>
<i>Sustained VT/VF</i>	48	27.0%	8	11.4%	40	37.0%		
<i>During S1 train</i>	17	35.4%	4	50.0%	13	32.5%	0.428	0.48 (0.10, 2.24)
<i>After S2</i>	31	64.6%	4	50.0%	27	67.5%		
<i>Monomorphic VT (&gt;3 beats)</i>	44	65.7%	7	53.8%	37	68.5%	0.344	0.54 (0.16, 1.84)
<i>Polymorphic VT/VF (&gt;3 beats)</i>	23	34.3%	6	46.2%	17	31.5%		
<i>VT (&gt;3 beats) Cycle Length (ms)</i>								
<i>During S1 train, n=19</i>	333 [216-350]		371 [361-379]		237 [215-346]		<b>0.024</b>	-
<i>After S2, n=48</i>	330 [267-372]		438 [325-473]		324 [267-361]		<b>0.017</b>	-

Categorical variables are expressed as frequency and percentage. Differences between 500 ms and 300 ms BDCL were tested with Fisher's exact test. Continuous variables are expressed as median and interquartile range (percentiles 25% and 75%). Mann-Whitney's U test (non-parametric) was used. VT: Ventricular Tachycardia. VF: Ventricular Fibrillation. OR: Odds Ratio.

### Individual and Median Scores of the Induced Arrhythmias

**Supplementary Figures 10A** (control group) and **10B** (HF-ER group) show the median and maximum scores reached by every individual heart at each setting, pacing at 300ms BDCL.

Consecutive attempts of induction can elicit differently scored arrhythmias. To consider this variability, we obtained not only a maximum score (worst elicited arrhythmia), but also a median score for the arrhythmias elicited at each heart and combination of factors tested, pacing at 300 ms BDCL. This resulted in 56 median score values (14 hearts, 4 settings). Both median (**Supplementary Figure 10C**) and maximum scores (**Figure 8A**) were significantly higher in HF-ER hearts and during increased IVP. The AA-milieu showed a trend to increase median scores ( $p=0.063$ , **Supplementary Figure 10C**), although it did not significantly modify maximum scores (**Figure 8A**). **Supplementary Figure 10D** shows median scores rising when any of the three proarrhythmic factors (HF-ER, increased IVP and AA-milieu) are progressively included.



**Supplementary Figure S10. A-B.** Individual arrhythmic scores in control (A) and HF-ER (B) hearts. Median scores were significantly higher in control hearts in the presence of an AA-milieu; however, this deleterious effect of the AA-milieu was not found when analyzing the worst elicited arrhythmia in these hearts. This suggests that, in normal hearts, the AA-milieu increases the likelihood of inducing arrhythmias by PES, but not necessarily their severity. Again, this analysis confirmed the important effect of increased IVP since maximum scores were higher when increased IVP was applied in both control and HF-ER hearts. Of note, the AA-milieu did not significantly modify the median or maximum scores in HF-ER hearts. **WSR:** Wilcoxon's Signed Ranks Test (non-parametric, paired). **C.** Median scores at 300 ms BDCL ( $n=56$ ). Scores are detailed in Methods. Since score data did not follow normal distributions, results are displayed as median (symbols) and interquartile range (bars). Both HF-ER and increased IVP were significantly associated to higher median scores. **C.** Arrhythmia inducibility as a function of the number of proarrhythmic factors simultaneously present. Medians are displayed as thick bars. Note how scores build up as additional proarrhythmic factors are progressively included, showing a positive and highly significant correlation. **MWU:** Mann-Whitney's U test (non-parametric, non-paired), **WSR:** Wilcoxon's Signed Ranks Test (non-parametric, paired). **SC:** Spearman's Correlation (non-parametric), **JT:** Jonckheere-Terpstra's test (non-parametric).

### Heterogeneity in the Arrhythmic Response to PES

The use of programmed electrical stimulation (PES) with trains consisting of at least 8 S1 + S2 (S2: 10 ms over the ERP) should have homogenized the arrhythmic response of a given heart under the same conditions, and indeed this was the case most of the time. And yet, we found some cases in which consecutive pacing sequences with the same S1/S2 coupling interval induced different scored arrhythmias under identical conditions. We even observed some extreme cases in which some sequences did not elicit any arrhythmia at all (score=0), whereas a

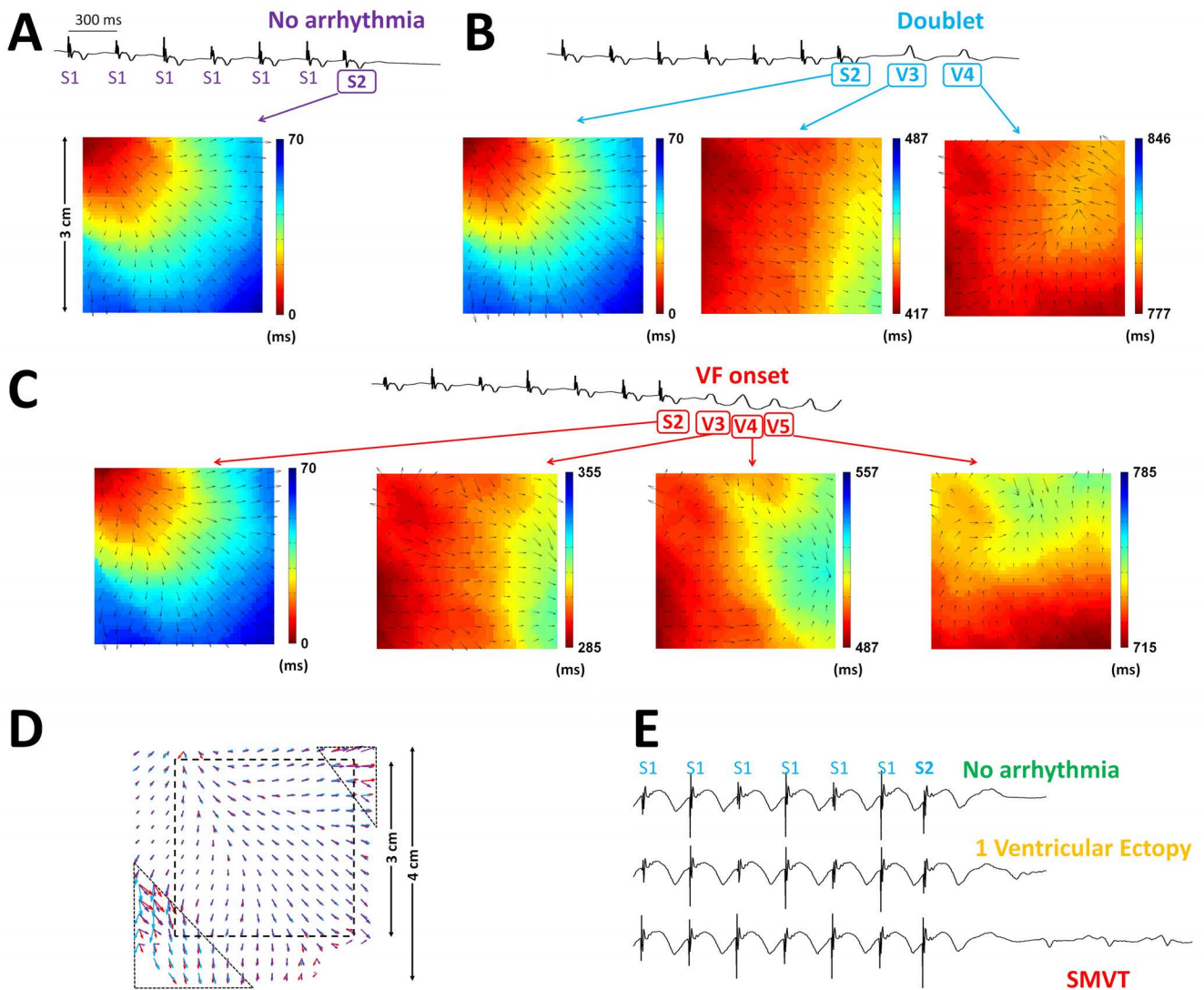
sustained arrhythmia (score $\geq$ 6) was induced shortly before or after that, under exactly the same conditions.

This situation was found in 8 out of the 14 hearts (57%, 4 control, 4 HF-ER), always pacing at 300 ms, with the AA-milieu and increased IVP being simultaneously present. This fact suggests that the interaction between an acidified and adrenergic environment (AA-milieu) and the stretch produced by an increased IVP dramatically enhance the heterogeneity of arrhythmia inducibility in both control and HF-ER hearts. An example is shown in **Supplementary Figure S11A-C** and **Supplementary Movies S1-S3**, where the last S2 and the first arrhythmic wavefronts (if any) are displayed after consecutive attempts of inducing arrhythmias under exactly the same conditions (300 ms BDCL + S2, coupling interval ERP + 10 ms, high IVP + AA-milieu) resulting in scores of 0 (no arrhythmia), 2 (doublet) and 8 (VF) respectively.

Despite the fact that we performed a comprehensive analysis of the optical data in our field of view, we were unable to determine the exact mechanisms underlying the increased heterogeneity under the combination of increased IVP and AA-milieu. Although other initiating mechanisms may not be ruled out, from a reentry point of view we believe that the observed minor changes in wavefront orientation and velocity in peripheral areas of the extended field of view (**Supplementary Figure S11D**) might have modified the time of arrival of the S2 waves at some line/s of block outside our optical field of view, conditioning whether reentry or a mere line of activation block occurs.<sup>27</sup>

## Supplementary Movies

**Supplementary Movies S1-S3:** Representative example of the intra-subject heterogeneity on the induced arrhythmias under the combination of AA-milieu and increased IVP, pacing at 300 ms BDCL + S2 (coupling interval: ERP + 10 ms). The last S2 and the first arrhythmic wavefronts (if any) are shown after consecutive attempts of inducing arrhythmias under exactly the same conditions in a control heart. These attempts resulted in scores of 0 (no arrhythmia, **movie S1**), 2 (doublet, **movie S2**) and 8 (VF, **movie S3**) respectively. There were no differences in propagation or repolarization of the S2 waves within the routinely analyzed area (square, 3x3 cm<sup>2</sup>). But from a reentry point of view we believe that the observed minor changes in wavefront orientation and velocity in peripheral areas of the extended field of view (see **Supplementary Figure S11**) might have modified the time of arrival of the S2 waves at some line/s of block outside our optical field of view, conditioning whether reentry or a mere line of activation block occurred.<sup>27</sup>



**Supplementary Figure S11.** Representative example of the intra-subject heterogeneity on the induced arrhythmias under the combination of AA-milieu and increased IVP, pacing at 300 ms BDCL + S2 (coupling interval: ERP + 10 ms) in a control heart (ECG + optical maps). **A, B, C.** Three consecutive attempts of induce arrhythmias under identical conditions resulted in arrhythmic scores of 0 (**A**), 2 (a doublet, **B**) and 8 (VF, **C**). See **Supplementary Movies S1-S3**. **D.** Superimposed conduction velocity maps of the S2 wavefronts in the 3 consecutive attempts of induction (purple: score 0, blue: score 2, red: score 8). Of note, there were no differences in propagation or repolarization of the S2 waves within the routinely analyzed area (square, 3x3 cm<sup>2</sup>). However, propagation patterns started to differ at peripheral areas of the extended field of view (areas surrounded by triangles). This might have resulted in just enough different arrival times at potential lines of block (outside the field of view) to induce differently scored arrhythmias, since the timing of arrival of the S2 wave at the distal side of the line of activation block relative to the repolarization time of the proximal side of the line of block is the critical parameter for differentiating between the occurrence of reentry and the mere occurrence of a line of activation block (and no reentry).<sup>27</sup> **E.** ECG example of the same phenomenon in a HF-ER heart.

## References

- (1) Moreno J, Zaitsev AV, Warren M, Berenfeld O, Kalifa J, Lucca E, Mironov S, Guha P, Jalife J. Effect of remodelling, stretch and ischaemia on ventricular fibrillation frequency and dynamics in a heart failure model. *Cardiovasc Res* 2005;65:158-166.
- (2) Quintanilla JG, Moreno J, Archondo T et al.  $K_{ATP}$  channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res* 2013;99:576-585.
- (3) Vermeulen JT, McGuire MA, Opthof T, Coronel R, de Bakker JM, Klopping C, Janse MJ. Triggered activity and automaticity in ventricular trabeculae of failing human and rabbit hearts. *Cardiovasc Res* 1994;28:1547-1554.
- (4) Burton FL, Cobbe SM. Effect of sustained stretch on dispersion of ventricular fibrillation intervals in normal rabbit hearts. *Cardiovasc Res* 1998;39:351-359.
- (5) Jalal S, Williams GR, Mann DE, Reiter MJ. Effect of acute ventricular dilatation on fibrillation thresholds in the isolated rabbit heart. *Am J Physiol* 1992;263:H1306-H1310.
- (6) Reiter MJ, Synhorst DP, Mann DE. Electrophysiological effects of acute ventricular dilatation in the isolated rabbit heart. *Circ Res* 1988;62:554-562.
- (7) Reiter MJ, Zetelaki Z, Kirchhof CJ, Boersma L, Allessie MA. Interaction of acute ventricular dilatation and d-sotalol during sustained reentrant ventricular tachycardia around a fixed obstacle. *Circulation* 1994;89:423-431.
- (8) Reiter MJ, Landers M, Zetelaki Z, Kirchhof CJ, Allessie MA. Electrophysiological effects of acute dilatation in the isolated rabbit heart: cycle length-dependent effects on ventricular refractoriness and conduction velocity. *Circulation* 1997;96:4050-4056.
- (9) Sung D, Mills RW, Schettler J, Narayan SM, Omens JH, McCulloch AD. Ventricular filling slows epicardial conduction and increases action potential duration in an optical mapping study of the isolated rabbit heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;14:739-749.
- (10) Lou Q, Li W, Efimov IR. The role of dynamic instability and wavelength in arrhythmia maintenance as revealed by panoramic imaging with blebbistatin vs. 2,3-butanedione monoxime. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:H262-H269.

- (11) Fedorov VV, Lozinsky IT, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Rosen MR, Balke CW, Efimov IR. Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm* 2007;4:619-626.
- (12) Brack KE, Narang R, Winter J, Ng GA. The mechanical uncoupler blebbistatin is associated with significant electrophysiological effects in the isolated rabbit heart. *Exp Physiol* 2013;98:1009-1027.
- (13) Swift LM, Asfour H, Posnack NG, Arutunyan A, Kay MW, Sarvazyan N. Properties of blebbistatin for cardiac optical mapping and other imaging applications. *Pflugers Arch* 2012;464:503-512.
- (14) Brines L, Such-Miquel L, Gallego D et al. Modifications of mechanoelectric feedback induced by 2,3-butanedione monoxime and Blebbistatin in Langendorff-perfused rabbit hearts. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;206:29-41.
- (15) Laurita KR, Girouard SD, Rosenbaum DS. Modulation of ventricular repolarization by a premature stimulus. *Circ Res* 1996;79:493-503.
- (16) Laurita KR, Girouard SD, Akar FG, Rosenbaum DS. Modulated dispersion explains changes in arrhythmia vulnerability during premature stimulation of the heart. *Circulation* 1998;98:2774-2780.
- (17) Baker LC, London B, Choi BR, Koren G, Salama G. Enhanced dispersion of repolarization and refractoriness in transgenic mouse hearts promotes reentrant ventricular tachycardia. *Circ Res* 2000;86:396-407.
- (18) Mironov SF, Vetter FJ, Pertsov AM. Fluorescence imaging of cardiac propagation: spectral properties and filtering of optical action potentials. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H327-H335.
- (19) Glukhov AV, Fedorov VV, Lou Q, Ravikumar VK, Kalish PW, Schuessler RB, Moazami N, Efimov IR. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle. *Circ Res* 2010;106:981-991.
- (20) Glukhov AV, Fedorov VV, Kalish PW, Ravikumar VK, Lou Q, Janks D, Schuessler RB, Moazami N, Efimov IR. Conduction remodeling in human end-stage nonischemic left ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 2012;125:1835-1847.

- (21) Bayly PV, KenKnight BH, Rogers JM, Hillsley RE, Ideker RE, Smith WM. Estimation of conduction velocity vector fields from epicardial mapping data. *IEEE Trans Biomed Eng* 1998;45:563-571.
- (22) Efimov IR, Huang DT, Rendt JM, Salama G. Optical mapping of repolarization and refractoriness from intact hearts. *Circulation* 1994;90:1469-1480.
- (23) Akar FG, Nass RD, Hahn S, Cingolani E, Shah M, Hesketh GG, DiSilvestre D, Tunin RS, Kass DA, Tomaselli GF. Dynamic changes in conduction velocity and gap junction properties during development of pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1223-H1230.
- (24) Efimov IR, Nikolski VP, Salama G. Optical imaging of the heart. *Circ Res* 2004;95:21-33.
- (25) Davis CS. Methods based on extensions of generalized lineal models. In *Statistical methods for the analysis of repeated measurements*. New York: Springer-Verlag; 2002.
- (26) Harada M, Tsuji Y, Ishiguro YS, Takanari H, Okuno Y, Inden Y, Honjo H, Lee JK, Murohara T, Sakuma I, Kamiya K, Kodama I. Rate-dependent shortening of action potential duration increases ventricular vulnerability in failing rabbit heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300:H565-H573.
- (27) Coronel R, Wilms-Schopman FJ, Opthof T, Janse MJ. Dispersion of repolarization and arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2009;6:537-543.









## Capítulo 4

**K<sub>ATP</sub> channel opening  
accelerates and  
stabilizes rotors in a  
swine heart model of  
ventricular fibrillation**

*Cardiovasc Res 2013; 99:576-585*



# K<sub>ATP</sub> channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation

Jorge G. Quintanilla<sup>1\*</sup>, Javier Moreno<sup>1</sup>, Tamara Archondo<sup>1</sup>, Ashley Chin<sup>2</sup>, Nicasio Pérez-Castellano<sup>1</sup>, Elena Usandizaga<sup>1</sup>, María Jesús García-Torrent<sup>1</sup>, Roberto Molina-Morúa<sup>1</sup>, Pablo González<sup>3</sup>, Cruz Rodríguez-Bobada<sup>3</sup>, Carlos Macaya<sup>1</sup>, and Julián Pérez-Villacastín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Optical Mapping Laboratory, Arrhythmia Unit, Cardiovascular Institute, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), CP 28040, Madrid, Spain; <sup>2</sup>McMaster University, Hamilton, ON, Canada; and <sup>3</sup>Experimental Medicine and Surgery Unit, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

Received 5 November 2012; revised 2 April 2013; accepted 14 April 2013; online publish-ahead-of-print 23 April 2013

Time for primary review: 30 days

<b>Aims</b>	The mechanisms underlying ventricular fibrillation (VF) are still disputed. Recent studies have highlighted the role of K <sub>ATP</sub> -channels. We hypothesized that, under certain conditions, VF can be driven by stable and epicardially detectable rotors in large hearts. To test our hypothesis, we used a swine model of accelerated VF by opening K <sub>ATP</sub> -channels with cromakalim.
<b>Methods and results</b>	Optical mapping, spectral analysis, and phase singularity tracking were performed in eight perfused swine hearts during VF. Pseudo-bipolar electrograms were computed. K <sub>ATP</sub> -channel opening almost doubled the maximum dominant frequency ( $14.3 \pm 2.2$ vs. $26.5 \pm 2.8$ Hz, $P < 0.001$ ) and increased the maximum regularity index ( $0.82 \pm 0.05$ vs. $0.94 \pm 0.04$ , $P < 0.001$ ), the density of rotors ( $2.0 \pm 1.4$ vs. $16.0 \pm 7.0$ rotors/cm <sup>2</sup> × s, $P < 0.001$ ), and their maximum lifespans (medians: 368 vs. $\geq 3410$ ms, $P < 0.001$ ). Persistent rotors ( $\geq 1$ movie = 3410 ms) were found in all hearts after cromakalim (mostly coinciding with the fastest and highest organized areas), but they were not epicardially visible at baseline VF. A 'beat phenomenon' ruled by inter-domain frequency gradients was observed in all hearts after cromakalim. Acceleration of VF did not reveal any significant regional preponderance. Complex fractionated electrograms were not found in areas near persistent rotors.
<b>Conclusion</b>	Upon K <sub>ATP</sub> -channel opening, VF consisted of rapid and highly organized domains mainly due to stationary rotors, surrounded by poorly organized areas. A 'beat phenomenon' due to the quasi-periodic onset of drifting rotors was observed. These findings demonstrate the feasibility of a VF driven by stable rotors in hearts whose size is similar to the human heart. Our model also showed that complex fractionation does not seem to localize stationary rotors.
<b>Keywords</b>	Ventricular fibrillation • Rotors • K <sub>ATP</sub> • Optical mapping

## 1. Introduction

The mechanisms that maintain ventricular fibrillation (VF) are still disputed.<sup>1</sup> Experimental models have demonstrated either spiral waves generated by periodic high-frequency sources (rotors),<sup>2</sup> multiple wavelets,<sup>3</sup> or focal sources<sup>4</sup> as possible mechanisms underlying VF dynamics. Previous studies in large animal hearts either failed to identify reentry/spiral waves on the epicardium, or recorded only very short-lived reentrant activity.<sup>5–11</sup> In the human heart, short-lived epicardial<sup>12,13</sup> and

intramural<sup>14</sup> spiral fronts and random propagation<sup>15</sup> have been found to coexist.

We hypothesized that, under certain conditions, VF can be driven by one or more stable and epicardially detectable rotors in hearts whose size is similar to the human heart. It is known that action potential duration (APD) abbreviation via potassium conductance accelerates reentry.<sup>15–17</sup> In addition, a recent study showed that blockade of K<sub>ATP</sub>-channels promoted spontaneous defibrillation in early VF,<sup>18</sup> which highlighted the role of these channels in VF maintenance. Thus, to test our

\* Corresponding author. Tel: +34 913303000; fax: +34 913303527; Email: jgarciaqui.hcsc@salud.madrid.org

hypothesis, we used a model of accelerated VF by opening  $K_{ATP}$  channels in a continuously perfused swine heart with cromakalim (CK), an  $I_{K-ATP}$  agonist which shortens ventricular refractoriness.<sup>17,19</sup>

We focused on rotor dynamics at baseline VF and after acceleration with CK to assess whether one or more 'leading rotors' could be detected epicardially sustaining VF locally, regionally, or globally. We also evaluated whether the acceleration of VF dynamics revealed significant anatomical differences in activation frequencies, VF organization, rotor location, and dynamics. The presence of long-lasting rotors would enable us to analyse their dynamics. Finally, by creating off-line pseudo-bipolar electrograms, we tested whether conventional electrophysiology catheters could locate the presence of persistent/leading rotors.

## 2. Methods

An expanded Methods section is available in the Supplementary material online.

### 2.1 Isolated heart preparation and optical recordings

The present study was conducted in accordance with the European (86/609/EEC) guidelines for the care and use of laboratory animals. Approval was granted by the committee on animal welfare of the Hospital Clínico San Carlos. Eight Pietrain pigs (20–30 kg weight) were selected. Under deep anaesthesia (ketamine 20 mg/kg, propofol 6 mg/kg, atracurium besylate 0.2 mg/kg, and 1.25 mg/kg/h, fentanyl 0.005 mg/kg/h, isoflurane 2%), the chest was opened to expose the heart. ECG, expired  $CO_2$ , pulse-oximetry, and rectal temperature were carefully monitored. VF was induced by a brief application of 9 V DC current.<sup>4,10,11</sup> Then, hearts were excised, cooled, and rapidly connected to a Langendorff apparatus, to be perfused with Tyrode's solution as previously described.<sup>7</sup> Measurements were performed at least 5 min after VF induction to allow steady-state conditions to be attained.<sup>10,11,20</sup> No electromechanical uncouplers were used. Volume-conducted ECG was continuously registered. Movies of Di-4-ANEPPS fluorescence changes were recorded (3.41 s) using a CCD camera during VF as described elsewhere,<sup>7</sup> focusing on anterior and posterior walls of the left and right ventricles. The same protocol was repeated during accelerated VF in the presence of a new Tyrode's solution with 10  $\mu M$  CK.<sup>17</sup> In hearts #3–8, an additional set was taken during CK stage several minutes later to check for VF pattern reproducibility.

### 2.2 Spectral analysis, phase singularities, and rotor tracking

Previous publications have described dominant frequency<sup>21</sup> (DF) and phase singularity (PS) analysis in detail.<sup>10,11,22</sup> DF maps (5–35 Hz) were generated. As shown in Figure 1A and B, we determined the maximum DF ( $DF_{max}$ ) and the area activating at  $DF_{max}$ . The regularity index (RI) was determined and presented as RI maps.  $RI_{mean}$  and  $RI_{SD}$  were calculated.  $RI_{max}$  was obtained from the pixels with the highest periodicity. The averaged value for the 10% most organized pixels ( $RI_{10\%-max}$ ) was also obtained.

Phase movies (Figure 1C) were created by Hilbert transform<sup>10,22</sup> and PS detection was performed. We used spatiotemporal 'clustering' to track PS (Figure 1D). PS life span was calculated, and for those PS lasting  $\geq 1$  rotation (rotors), the core area was estimated (Figure 1E). For each recording, we calculated the density of rotors (defined as number of rotors arising per time and surface unit, rotors/cm<sup>2</sup> × s), density of rotors lasting  $\geq 200$  ms,<sup>6</sup> rotor maximum life span (ms), and mean core area (mm<sup>2</sup>).

### 2.3 Pseudo-bipolar electrograms

Pseudo-bipolar electrograms simulating the signal obtained with three types of conventional electrophysiology catheters (Figure 1F) were derived as

previously described,<sup>23</sup> to test the correlation between complex fractionation and rotors.

## 2.4 Statistical analysis

After testing for normality (Shapiro–Wilk), repeated measures ANOVA was used to test for significant differences. Wilcoxon's and Friedman's tests (non-parametric) were used when distributions differed significantly from normality. Continuous variables are generally expressed in text as mean  $\pm$  SD and displayed by Tuckey's box plots. Boxes represent the median (thick line) and interquartile range (Median [ $P_{25\%}$ – $P_{75\%}$ ]). Whiskers show the minimum and maximum values, except when an outlier value is found, which is depicted as a point. Mean is displayed as '+'. Accelerated VF (CK) data were averaged from the two sets of movies when available. Categorical variables were analysed using Fisher's exact test. Linear regression was performed to estimate the relation between the rate of drifting rotors and their velocities with inter-domain frequency gradients. A two-tailed  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1 Spectral analysis

Figure 1 shows an example of spectral analysis data (heart #3, posterior RV) at baseline VF (A) and at accelerated VF after CK (B). CK almost doubled  $DF_{max}$  ( $14.3 \pm 2.2$  vs.  $26.5 \pm 2.8$  Hz,  $P < 0.001$ ) in all four anatomical regions (Figure 2A). The tissue activating at  $DF_{max}$  was significantly larger with CK when globally analysed ( $11.4 \pm 14.9$  vs.  $23.02 \pm 19.4\%$ ,  $P = 0.04$ , Figure 2B), although this difference was mainly obtained from anterior LV recordings.

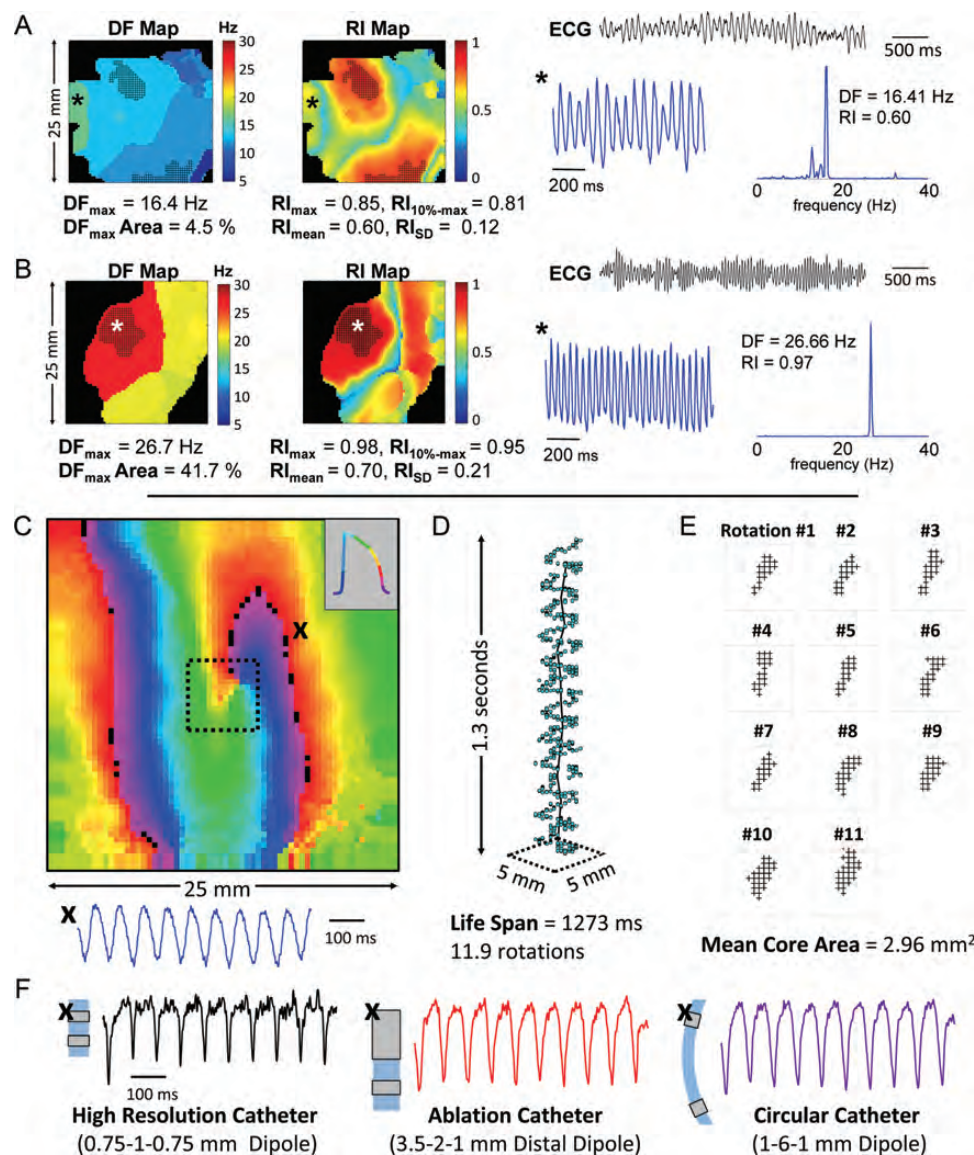
$RI_{max}$  was higher after CK ( $0.82 \pm 0.05$  vs.  $0.94 \pm 0.04$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 2C), with  $RI_{10\%-max}$  showing comparable results (Figure 2D). Both variables indicated the presence of more organized, localized areas in accelerated VF. At a more global basis,  $RI_{mean}$  was not significantly modified by CK (Figure 2E). A higher  $RI_{SD}$  was found in the presence of CK ( $0.13 \pm 0.02$  vs.  $0.21 \pm 0.03$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 2F). Of note,  $RI_{mean}$  and  $RI_{10\%-max}$  were higher in the RV than in the LV in both baseline VF and accelerated VF.

All the spectral analysis data suggested that acceleration of VF yielded faster and more organized areas (higher  $DF_{max}$ ,  $RI_{max}$ , and  $RI_{10\%-max}$ ) interspersed with areas of poor organization (similar  $RI_{mean}$ , higher  $RI_{SD}$ ) as in fibrillatory conduction, but it did not reveal important anatomical differences other than those that previously existed at baseline VF.

### 3.2 Rotor density, stability, and core size

At baseline VF, the density of rotors was significantly higher on the LV (LV:  $2.5 \pm 1.6$  vs. RV:  $1.5 \pm 1.0$  rotors/cm<sup>2</sup> × s;  $P = 0.015$ ), and the posterior walls ( $2.1 \pm 1.5$  vs. anterior walls:  $1.8 \pm 1.3$  rotors/cm<sup>2</sup> × s,  $P = 0.026$ ). CK dramatically increased such density (averaged baseline VF:  $2.0 \pm 1.4$  rotors/cm<sup>2</sup> × s vs. CK-VF:  $16.0 \pm 7.0$  rotors/cm<sup>2</sup> × s,  $P < 0.001$ ) blunting the regional differences found in baseline recordings (Figure 3A).

As shown in Figure 3B, the density of rotors lasting  $\geq 200$  ms increased nine-fold after CK ( $0.21 \pm 0.17$  vs.  $1.82 \pm 0.8$  rotors/cm<sup>2</sup> × s,  $P < 0.001$ ), with a slightly higher density in the RV ( $P = 0.06$ ). CK decreased the rotor core area by 42% ( $2.4 \pm 0.6$  vs.  $1.4 \pm 0.41$  mm<sup>2</sup>,  $P < 0.001$ ; Figure 3C), with slightly smaller cores in the RV ( $P = 0.05$ ). The duration of the longest rotors was clearly increased by CK (368 [281–449] ms vs. 3410 [981–3410] ms,  $P < 0.001$ , Figure 3D). However, this latter value was likely underestimated, as extremely stable rotors with life spans



**Figure 1** (A) Baseline VF and (B) accelerated VF (cromakalim). DF and RI maps from VF movies (3.41 s, heart #3, posterior RV) and corresponding ECG. Shaded areas show the 10% most organized pixels. Rightmost panels show a single pixel recording (1 s) and its power spectrum (from 3.41 s) from the location marked by the asterisk in the DF and RI maps. (C) Phase movie snapshot showing a rotator from another heart. Optical action potentials from the point marked with an 'x' are shown. (D) Three-dimensional ( $x,y,t$ ) representation of phase singularity (PS) tracking, showing the long-standing rotor in the dotted squared area in (C). Green points, PS positions; solid line, rotor trajectory. (E) Two-dimensional display of the core areas enclosed by the rotating PS in the highlighted square in (C and D). The rotor mean core area is calculated as a 10% trimmed-mean of these areas. (F) Example of derived pseudo-bipolar electrograms as would be obtained from three different types of catheters in the same example used in (C–E) where 'x' marks the left superior corner of the virtual catheters placed in the region depicted in (C). Note that, in comparison with the core area (E), the size and/or the distance between poles would be too large to allow any reasonable conclusions about fragmentation or lack thereof within the core.

that exceeded the duration of entire movie were consistently found epicardially (hereafter termed 'persistent rotors', lasting  $\geq 3.41$  s,  $\geq 90$  rotations in most CK cases).

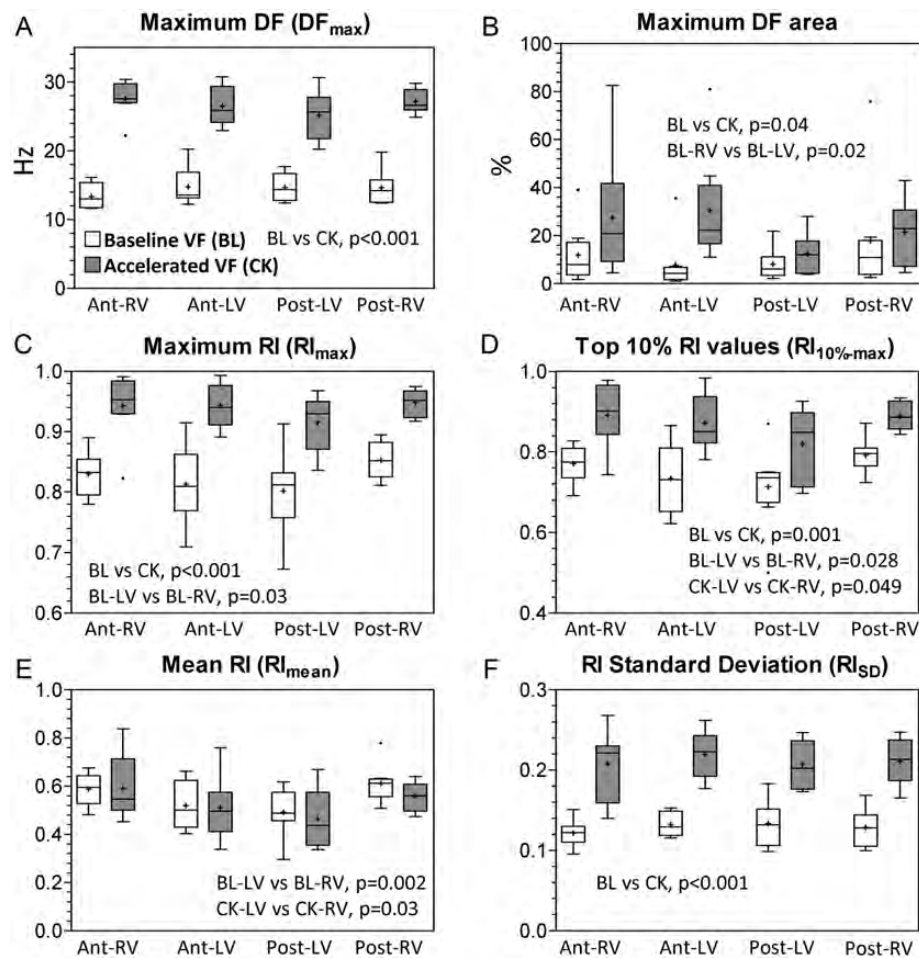
Figure 3E shows anatomical locations of persistent rotors. They were found in all hearts (8/8) after CK but were not epicardially detectable in any baseline VF recordings ( $P < 0.001$ ). No anatomical preponderance was found since they were present in both ventricles and affected different regions in similar ways [(Anterior-RV: 7/8 vs. Anterior-LV: 5/8 vs. Posterior-LV: 4/8 vs. Posterior-RV: 4/8, pNS); (LV: 8/8 vs. RV: 7/8, pNS); (Anterior: 7/8 vs. posterior: 6/8; pNS)]. All persistent rotors

were non-drifting, stationary rotors. Thus, CK promoted both the stationarity and the duration of rotors.

### 3.3 Persistent and leading rotors: correlation with activation and organization

To assess whether the induced high-frequency persistent rotors were the sources that maintained VF, we evaluated the relationship between their presence and the activation frequency and organization in the regional domains, as shown in Table 1. During any given





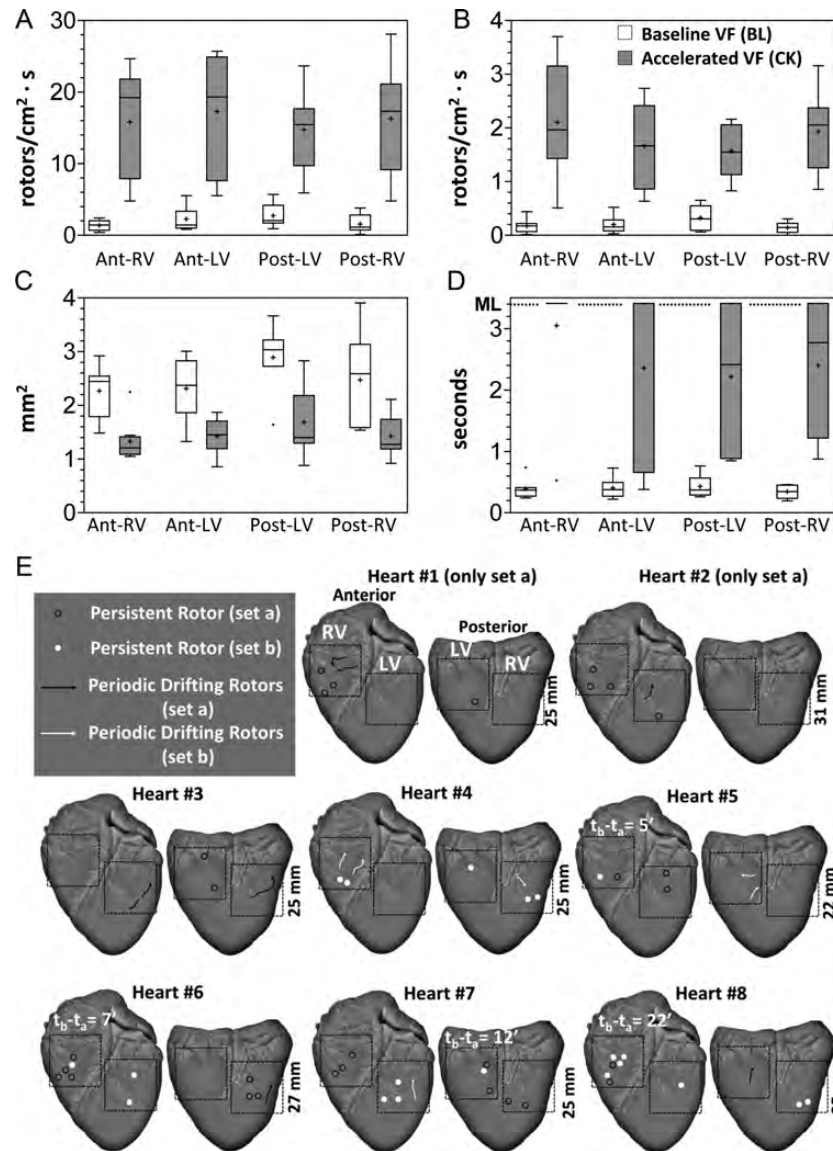
**Figure 2** Spectral analysis results ( $n = 8$  hearts). (A) Maximum dominant frequency. (B) Percentage of unmasked area activating at maximum DF. (C) Maximum regularity index. (D) Averaged RI value for the 10% most organized pixels. (E) Mean regularity index. (F) Standard deviation of RI values.

episode, all anatomical areas were capable of hosting the highest  $DF_{max}$  domain (anterior-RV: 5/8 vs. anterior-LV: 1/8 vs. posterior-LV: 4/8 vs. posterior-RV: 1/8,  $pNS$ ). In all hearts (8/8), the anatomical areas with the highest  $DF_{max}$  value contained persistent rotors in at least one of the two sets. In 18 out of the 24 (75%) areas with persistent rotors, these were located in the regions of the local highest frequency domain, behaving as local leading rotors. Indeed, in six out of the eight hearts (75%), one or more persistent rotors were found in the domain with the highest  $DF_{max}$  of the whole heart (hereafter referred to as 'global leading rotors') in at least one set. In two out of the six hearts with two sets of films (#3 and #4),  $DF_{max}$  values decreased in the second set. In the remaining,  $DF_{max}$  increased in one or more regions during set 'b'. In five out of the six hearts with two sets, the highest  $DF_{max}$  domain remained at the same location in both sets. In two out of these five, global leading rotors were not present epicardially in the first set, but were present in the second set (#4 and #8). The opposite situation was observed in the heart #3. In the remaining two hearts, global leading rotors were observed epicardially within the same region in both sets (#5 and #7). In all hearts, the most organized regions (highest  $RI_{10\%-max}$ ) contained one or more persistent rotors, and in six out of the eight hearts (75%), the most organized area coincided anatomically with the fastest one in at least one set.

Figure 4 shows an example (heart #3, set 'a' in Table 1) in which two highly stable persistent rotors with the same chirality co-existed on the posterior LV. The fact that both rotors rotated at exactly the same frequency suggests that they were coupled. After 1780 rotations, the rotor with the dark blue trajectory remained active and stable, giving rise to wavefronts at 28.1 Hz and maintaining the fastest and most organized ( $RI_{10\%-max}$ ) domain among the four filmed surfaces. Figure 5 shows VF dynamics on the anterior RV of heart #1 at baseline (A) and upon CK-induced acceleration (B). Figure 5B shows the temporal course of the trajectories of three persistent rotors in a 25.78 Hz domain. These were neither local nor global leading rotors, since a higher frequency domain (27.54 Hz) was found on the right side of the filmed region.

### 3.4 Quasi-periodic drifting rotors on inter-domain boundaries: beat phenomenon

Some of the observed drifting rotors showed a peculiar behaviour. Figure 3E shows the locations at which drifting rotors appeared quasi-periodically on inter-domain boundaries. An example is shown in Figure 6A as 'non-vertical' rotors. Due to their periodicity in the time domain, optical action potentials (Figure 6B) showed in most cases a clear beat phenomenon at inter-domain borders. Low values (white



**Figure 3** Rotor density, stability, and core results ( $n = 8$  hearts). (A) Rotor density. BL vs. CK ( $P < 0.001$ ); BL-LV vs. BL-RV ( $P = 0.015$ ); BL-anterior vs. BL-posterior ( $P = 0.026$ ). (B) Rotor ( $\geq 200$  ms) density. BL vs. CK ( $P < 0.001$ ); CK-LV vs. CK-RV ( $P = 0.06$ ). (C) Rotor core area. BL vs. CK, ( $P < 0.001$ ); BL-ant vs. BL-post ( $P = 0.028$ ); CK-LV vs. CK-RV ( $P = 0.05$ ). (D) Maximum rotor life span. Note that it exceeded the movie duration in the anterior RV in all the hearts except #3 (outlier point) in at least one set of movies. ML, movie length. BL vs. CK ( $P < 0.001$ ). (E) Anatomical distribution of stationary persistent rotors (life span  $\geq 1$  movie = 3.41s) and quasi-periodic drifting rotors. Up to four simultaneous persistent rotors were observed in some areas.  $t_b - t_a = x'$ : time elapsed between movies focused on the same region when persistent rotors were found in both sets.

circles) in the optical envelope (signal outer contour, in red), corresponded to the times when the rotor core passed through the analysed pixel. Spectral analysis of optical signals at such boundaries showed two distinct peaks matching the frequencies of the adjacent domains ( $DF_{high}$  and  $DF_{low}$ ).

The rate of appearance of these quasi-periodic drifting rotors ( $f_{beat} = 1/T_{beat}$ ) and the DF gradient between the highly organized adjacent domains ( $\Delta DF = DF_{high} - DF_{low}$ ) showed a very high correlation [ $R^2 = 0.99$ ,  $f_{beat} = 1.01 \cdot \Delta DF - 0.01$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 6C]. Thus, their rate of appearance on a particular epicardial spot depended on the frequency gradient between the interspersed domains ( $f_{beat} = \Delta DF$ ) and this periodicity in time could be predicted as  $T_{beat} = 1/f_{beat} = 1/\Delta DF$ . The drifting velocity of these rotors was also dependent on the inter-domain

frequency gradient [ $R^2 = 0.95$ , drifting velocity (mm/s) =  $6.38 \cdot \Delta DF + 1.01$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 6C]. For example, in Figure 5B, the inter-domain frequency gradient at  $t = 60$  increased from 1.7 to 2 Hz yielding acceleration of the quasi-periodic drifting rotors. Thus, the higher the frequency gradient, the higher the rate of appearance of these quasi-periodical drifting rotors and the faster their drift.

### 3.5 Rotors and pseudo-bipolar recordings

From the foregoing, it is clear that CK results in long-lasting, high-frequency rotors in the swine heart. Since rotors may be stationary or may drift over appreciable distances, which can only be appreciated by high-resolution mapping, we used single pseudo-bipolar electrograms as a surrogate for conventional electrophysiology recordings to evaluate



**Table 1** Regional distribution of maximum values of DF and RI and relation with epicardial persistent rotors (PR) in accelerated VF (cromakalim)

	Anterior RV DF <sub>max</sub> (Hz) / RI <sub>10%-max</sub>	Anterior LV DF <sub>max</sub> (Hz) / RI <sub>10%-max</sub>	Posterior LV DF <sub>max</sub> (Hz) / RI <sub>10%-max</sub>	Posterior RV DF <sub>max</sub> (Hz) / RI <sub>10%-max</sub>
Heart 1. Set a	<b>27.4 / 0.97</b>	24.9 / 0.78	21.7 / 0.93	25.4 / 0.86
Heart 2. Set a	<b>27.9 / 0.92</b>	<b>24.0 / 0.98</b>	20.2 / 0.75	26.0 / 0.92
Heart 3. Set a	22.3 / 0.78	22.8 / 0.97	<b>28.1 / 0.98</b>	26.7 / 0.95
Heart 3. Set b	22.0 / 0.74	22.8 / 0.78	<b>23.9 / 0.83</b>	23.7 / <b>0.83</b>
Heart 4. Set a	<b>33.1 / 0.82</b>	32.8 / 0.72	29.6 / 0.90	31.1 / <b>0.91</b>
Heart 4. Set b	<b>28.5 / 0.96</b>	26.7 / 0.92	26.1 / 0.88	27.1 / 0.95
Heart 5. Set a	<b>27.6 / 0.97</b>	24.7 / 0.86	21.7 / 0.76	26.6 / 0.95
Heart 5. Set b	<b>27.9 / 0.91</b>	24.0 / 0.85	22.4 / 0.87	25.3 / 0.80
Heart 6. Set a	26.7 / 0.90	26.5 / <b>0.93</b>	<b>28.8 / 0.67</b>	26.2 / 0.89
Heart 6. Set b	<b>28.0 / 0.79</b>	<b>27.1 / 0.96</b>	26.2 / 0.73	26.6 / 0.90
Heart 7. Set a	30.4 / 0.94	29.9 / 0.78	<b>30.7 / 0.95</b>	<b>30.7 / 0.92</b>
Heart 7. Set b	30.3 / 0.74	30.5 / 0.88	<b>30.6 / 0.82</b>	28.9 / <b>0.94</b>
Heart 8. Set a	27.2 / <b>0.98</b>	<b>29.4 / 0.88</b>	23.6 / 0.84	27.0 / 0.81
Heart 8. Set b	26.6 / <b>0.97</b>	<b>27.0 / 0.97</b>	<b>27.0 / 0.55</b>	26.7 / 0.88

Values in bold are the highest among the four locations. White cells with a thin frame correspond to locations with  $\geq 1$  PR (lasting  $> 1$  movie = 3.41 s). Grey cells with a thin frame correspond to locations with  $\geq 1$  PR in the domain with the highest local DF (local leading rotors). Grey cells with a thick frame correspond to locations with  $\geq 1$  PR in the domain with the highest global DF (global leading rotors).

whether one could discriminate the fibrillating activity under them. We obtained pseudo-bipolar electrograms for three different types of catheters that are routinely used in the clinical electrophysiology lab and analyse recordings for: (i) stationary rotor core areas; (ii) areas next to them sharing the same DF domain; (iii) areas of drifting rotors, and (iv) overtly disorganized zones (encompassing multiple and small DF domains). In Figure 5C, no major difference was observed by any of the simulated catheters that could discriminate between a pseudo-bipolar electrogram on a stationary core area and one on adjacent tissue fibrillating at the same DF. The pseudo-electrograms for drifting rotors were highly organized but showed waxing and waning, with some fractionation as the core crossed the inter-electrode space. In contrast, complex and fractionated electrograms (multiple domains) that persisted in time were apparent only in the periphery away from persistent rotors.

## 4. Discussion

We implemented a model of accelerated VF to demonstrate the feasibility of a VF driven by stable and epicardially detectable rotors in a large mammalian heart, and studied its 'extreme' rotor dynamics. This was done by dramatically shortening ventricular refractoriness by opening  $K_{ATP}$ -channels while maintaining continuous perfusion. As opposed to a conventional VF study, this model allowed us to focus on long-standing rotors to evaluate their contribution to the fibrillation process. We found that VF frequencies were significantly accelerated and that very organized fibrillation islets sustained by highly periodic and stable rotors in time and space after  $K_{ATP}$ -channel opening. These islets were surrounded by poorly organized areas of fibrillatory conduction and peripheral wavebreak. A 'beat phenomenon' was clearly observed when rotors drifted periodically over inter-domain borders and

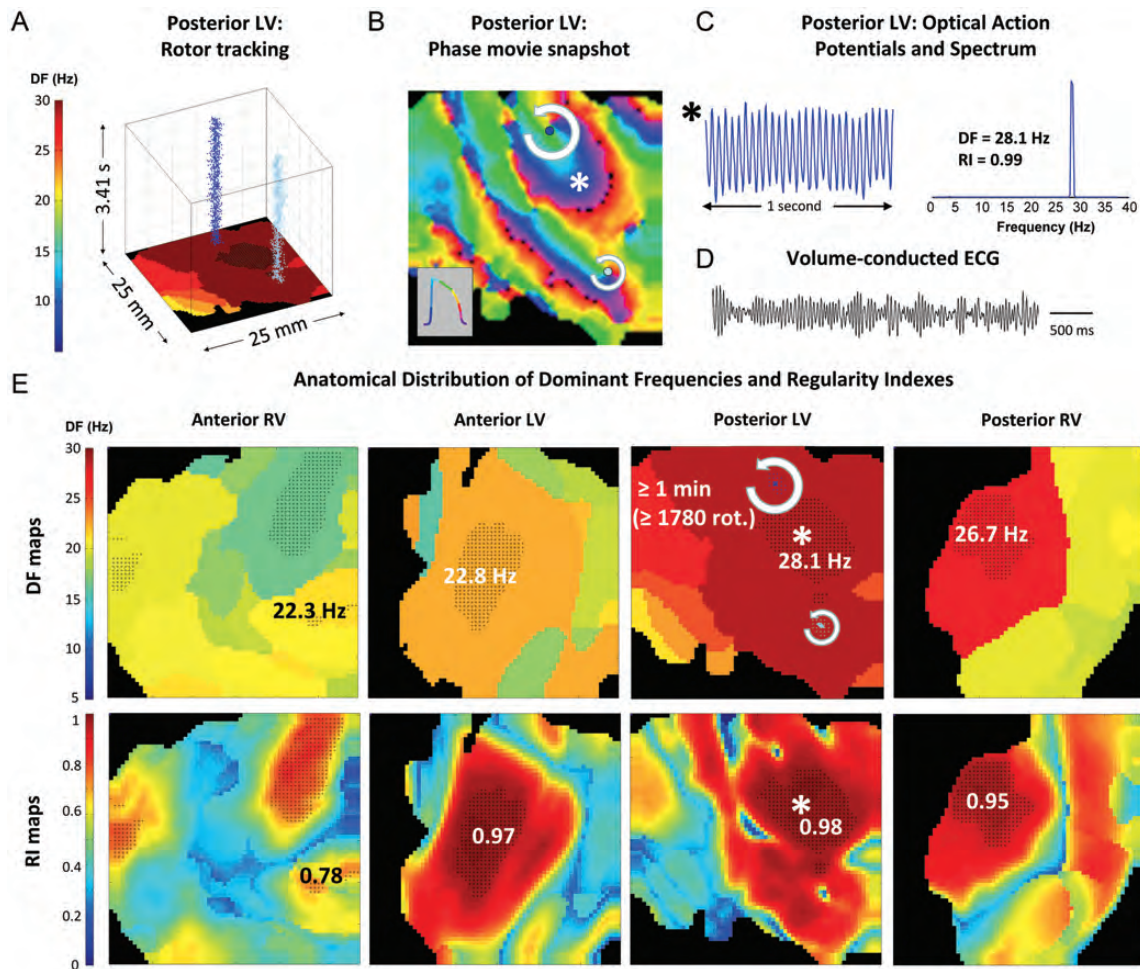
manifested itself as a periodic constructive/destructive amplitude interference. Thus, acceleration of VF led to a fibrillation clearly maintained by rotor/s, as opposed to multiple randomly wandering wavelets, but did not unveil important anatomical differences in activation frequencies, VF organization, rotor location, and dynamics. All these findings demonstrate that, under certain conditions, a clearly rotor-driven VF is feasible in a heart whose size is similar to the human heart. Finally, our model showed that complex fractionation in pseudo-electrograms is not apparent near the core of persistent stationary rotors and their domains.

### 4.1 Cromakalim and ATP-sensitive $K^+$ channels

ATP-sensitive  $K^+$  channels are inhibited by a high intracellular concentration of ATP and are closed under conditions of normal myocardial metabolism. Opening of these channels during myocardial ischaemia increases  $K^+$  efflux, accelerates repolarization, and shortens the APD. Some drugs like cromakalim open these channels.<sup>19</sup> In our experiments, CK shortened the APD significantly as we observed regions activated at 32 Hz, which corresponds to a very short APD (31 ms). A previous study of superfused but not perfused slices ( $< 2$  mm) of canine right ventricle mapped with a multielectrode array, showed that after superfusion with 10  $\mu$ M CK, there was a significant shortening of the refractory periods but no effect on conduction velocity.<sup>17</sup> In our study on the whole perfused heart, rotors had a significantly shorter cycle length and persisted longer after CK.

### 4.2 Accelerated VF and signal organization

In our study, accelerated VF showed areas of very rapid activation with a high spectral organization of action potentials as indicated by RI values close to 1. In contrast, very poorly organized areas were found adjacent



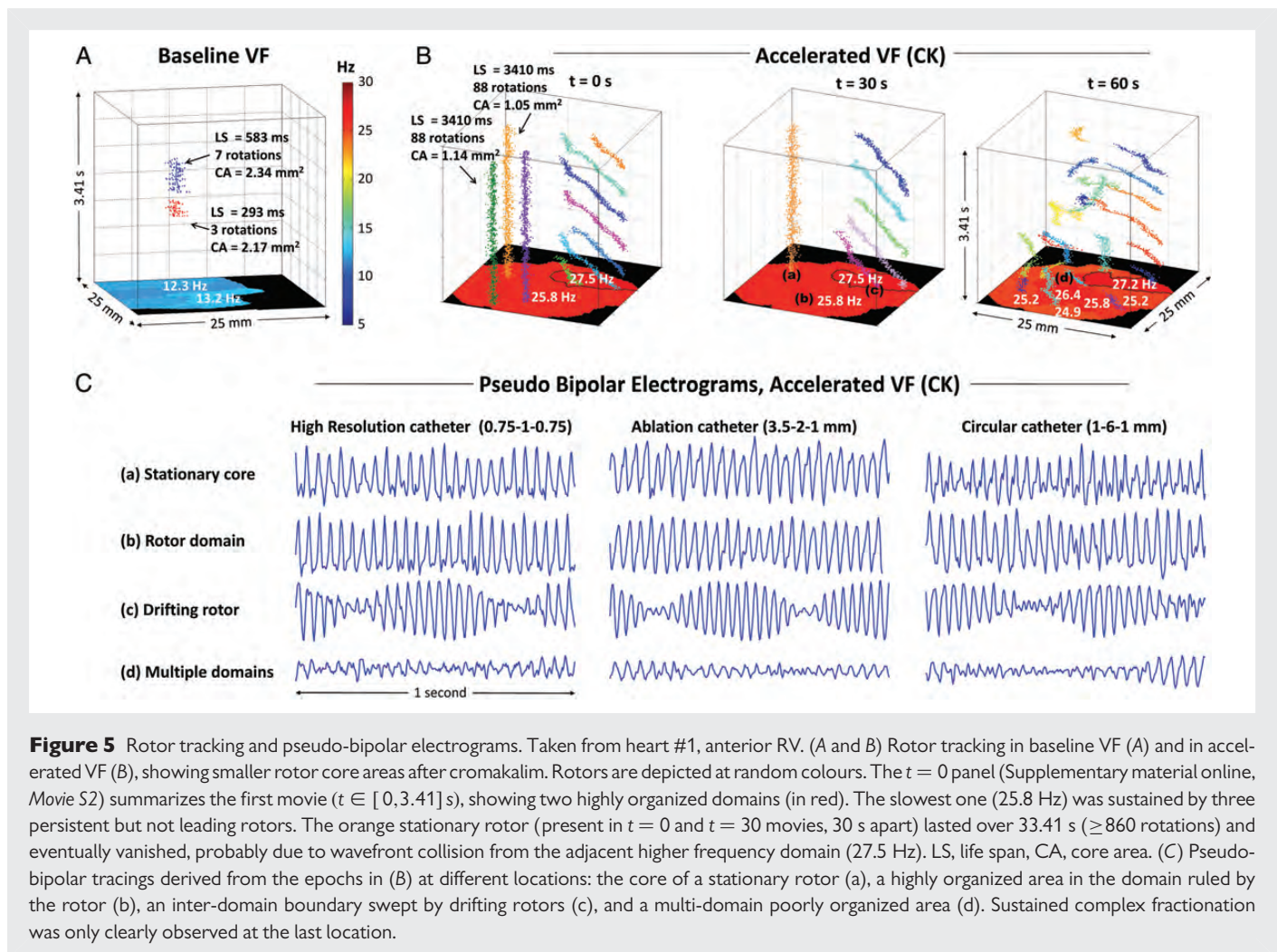
**Figure 4** Example of the spatial distribution of frequencies and spectral organization in a heart with global leading rotors. Taken from heart #3, set 'a'. (A and B) Two sustained epicardial global leading rotors (dark and light blue points in A, B, and E) maintaining the fastest domain in the whole heart (posterior LV, Supplementary material online, *Movie S1*). No more epicardial persistent rotors were found in this heart. The dark blue rotor was still active 1 min later (over 1780 revolutions) when the last movie of set 'a' from the same area was filmed. (C) Optical action potentials and spectrum in the pixel marked with the white asterisk in (B). (D) Volume-conducted ECG obtained during the same approximate period shows a clear VF pattern. (E) The anatomical areas adjacent to posterior LV host the domains with the second and third highest DFs. The anterior RV, not anatomically linked with the fastest domain, exhibited the lowest DFs. Of note, in RI maps, poorly organized areas (in blue) can be seen adjacent to the most organized ones (in red), suggesting peripheral wavebreak and fibrillatory conduction away from the main rotor. Shaded areas on DF and RI maps correspond to pixels with the top 10% RI values.

to these locations, increasing the standard deviation of RI values, most likely due to fibrillatory conduction and/or breakage of wavefronts. This finding has been described by others in more conventional VF, where the fastest regions displayed highly regular activity.<sup>2,9</sup> A highly significant increase in local organization after accelerating VF does not support a leading role of multiple wandering wavelets as the main mechanism maintaining this VF.

### 4.3 Rotor dynamics and $K^+$ currents

In all our hearts, substantially smaller rotor cores were observed in accelerated VF. These rotors were very stable in the short to medium term, undergoing hundreds to thousands of rotations before disappearing from the epicardium (*Figures 3–5*). Somewhat similar results have been reported in guinea pig hearts (up to 150 rotations),<sup>2</sup> or by increasing  $I_{K1}$  in mice,<sup>16</sup> or  $I_{Kr}$  in monolayers.<sup>15</sup> Another study in monolayers showed that not only an increased  $I_{K1}$  but also its heterogeneity may

contribute to the increased stability of spiral waves.<sup>24</sup> Rotor stability has been explained on the basis that the non-excited cells at the core provide a larger outward conductance than in baseline VF, decreasing the likelihood that these cells are excited by the depolarizing influence of its own rotor activation front (sink-to-source mismatch).<sup>16</sup> Additionally, the shorter APD minimizes any wavefront–wavetail interactions.<sup>16</sup> Conversely, prolongation of minimal APD in sustained fibrillation has been shown to decrease the number of simultaneous rotors in monolayers.<sup>25</sup> Regarding  $K_{ATP}$ -channels, we demonstrate that opening them promotes the formation and stabilization of rotors. Previously it was shown that blocking  $K_{ATP}$ -channels promoted spontaneous defibrillation during early VF in myopathic human hearts.<sup>18</sup> We believe that the pro-fibrillatory effects of  $K_{ATP}$ -channel opening demonstrated here are relevant to the human hearts since no major electrophysiological differences between pig and human hearts have been found except for potassium current  $I_{K1}$ .<sup>26</sup>



#### 4.4 Stationary persistent and leading rotors

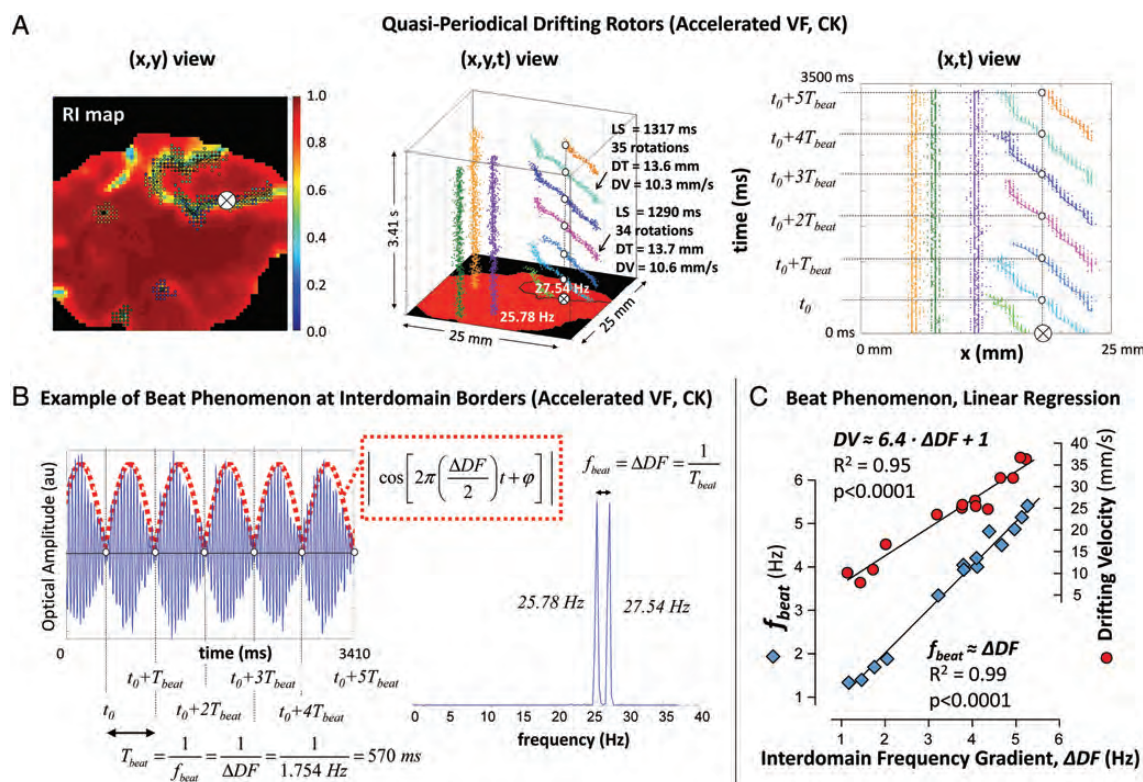
Our data support the idea that accelerated VF is maintained by one or more very organized leading rotors. In Figure 3E, heart #5 showed persistent rotors on the anterior RV in both sets in which this region was found to be the fastest and most organized. A similar situation was observed on the posterior LV of heart #7. Figure 4 shows the two epicardial global leading rotors on the posterior LV of heart #3. They were probably coupled and acting as mutually entrained drivers of the overall activity, similar to previous results in smaller hearts.<sup>2</sup> Although the global leading rotor in heart #3 was not epicardially visible after 8 min, the same region (posterior LV) remained the fastest (heart #3, set 'b' in Table 1), so this rotor might have turned into an intramural scroll wave with no epicardial manifestation of its filament. That possibility and the existence of intramural foci<sup>4</sup> can explain why epicardial persistent rotors were not seen in the fastest domains of some sets of accelerated VF, or even in baseline VF. Previous studies showing rapid and organized intramural activation,<sup>4,9</sup> intramural reentry,<sup>4</sup> or even transmural scroll wave activation<sup>14</sup> support this idea. However, even after promoting very stable rotors in our hearts, no anatomical region had a significant and reproducible preponderance, as reported by others in porcine VF models.<sup>5,6,8</sup> Only the anterior RV seemed to host a higher density of persistent rotors (Figure 3E), an area recently remarked as important for VF initiation.<sup>27</sup>

Occasionally, accelerated VF seems to be locally driven by rotors which need not be the fastest present in the heart. As shown in Figure 5, several persistent rotors may coexist in a small region, and complete hundreds of rotations without seemingly interacting with each other. Data in Figure 3E support this idea. For example, persistent rotors were found in heart #8 within the same anatomical region (anterior RV) in set 'a', and 22 min later in set 'b'. Interestingly, as shown in Table 1, this region was the most organized in both sets, even though the highest DF was on the anterior LV. Most remarkably, as demonstrated by our results,  $K_{ATP}$ -channel activation in the ventricles of a large mammalian heart makes them potentially capable of hosting long-standing rotors whose density is up to nine-fold greater than baseline, and whose significantly reduced core sizes allows them to activate and mutually interact at extremely short cycle lengths over relatively long periods of time.

#### 4.5 Beat phenomenon by quasi-periodical drifting rotors

Drifting rotors in accelerated VF appeared quasi-periodically at frequency domain borders, producing a 'beat phenomenon' governed by the frequency gradient (Figure 6). Physically, the beat phenomenon is explained as a time-dependent constructive–destructive alternating interference at the amplitude level between two periodic signals of





**Figure 6** Beat phenomenon in accelerated VF (Cromakalim). (A) Example of periodic drifting rotors in the movie starting at 't = 0' (from Figure 5B and Supplementary material online, Movie S2) showing (x,y), (x,y,t), and (x,t) views. Note the diagonal trajectories of drifting rotors as they appeared periodically over the inter-domain border. LS, lifespan; DT, drifting trajectory; DV, drifting velocity. (B) Example of beat phenomenon. Leftmost panel: optical action potentials from the pixel marked as a 'white encircled x' in (A). Their envelope (a rectified sinusoid) is displayed as a dashed red line, with a frequency  $f_{beat} = DF_{high} - DF_{low} = \Delta DF$ . White circles mark the times when the cores of the quasi-periodic drifting rotors are over the analysed pixel, resulting in a substantial decrease in the signal amplitude. The periodicity of their arrival can be predicted as  $T_{beat} = 1/(DF_{high} - DF_{low})$ . Rightmost panel: spectrum from the same pixel. Two peaks corresponding to the frequencies of the implicated domains are observed. (C) Linear regressions relating the rate of appearance of periodic drifting rotors ( $f_{beat}$ ) and their drifting velocities with  $\Delta DF$ .

comparable frequency.<sup>28</sup> In our context, these amplitude fluctuations can be explained by the consecutive approaches and withdrawals of the cores of the successive rotors drifting across the inter-domain border. We found that higher gradients were associated with higher onset rates and with faster drifting, as shown in Figure 6C. This phenomenon was reproducibly observed within different regions in all our hearts (Figure 3E). Such a periodic and predictable beat phenomenon can only be explained as an interaction of two extremely organized periodic sources, making random propagation unlikely to explain this finding. Although our observations explain only some local activation patterns, previous observations demonstrated that the VF patterns and the spectral width associated with rotor drift were predictable on the basis of the Doppler equations relating the rotation frequency of the rotor, the speed of its motion, and the wave speed.<sup>29</sup>

## 4.6 Complex fractionation and rotors

We created off-line pseudo-bipolar electrograms to evaluate whether conventional electrophysiology catheters can help to discriminate between rotors leading fibrillation locally, and zones of fibrillatory conduction, acting as bystanders. We found similar very highly organized patterns near the core of stationary rotors and their domains as opposed to persistent fractionation within the fibrillatory conduction

zones (Figure 5C). These findings are in agreement with previously reported results in atrial monolayers.<sup>23</sup> Thus, targeting persistently fractionated areas is unlikely to eliminate the drivers of fibrillatory activity.

## 4.7 Limitations

Only ~70% of the ventricular epicardium was filmed in our experiments. Thus we cannot draw conclusions about what might be happening on the remaining surfaces, transmurally or in the endocardium. The four analysed areas in each set were not filmed simultaneously but all were usually filmed within 5 min. Thus, we can only speculate that a global leading rotor was actually the fastest rotor in the heart at a particular time. Finally, our conclusions are drawn from an accelerated VF model, which is not intended to replicate the natural evolution of VF. It is conceived as an investigational tool, as monolayers or simulations, to further characterize rotors dynamics by promoting their occurrence and stability.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

## Acknowledgements

The authors thank Dr Sergey Mironov for providing us with his valuable 'Scroll' software. Also, Dr Delpón and Dr Tamargo for their assistance on Pharmacology, Mr Barquero-Pérez and Dr Rojo-Álvarez for sharing their 'Schzyo' system and for useful discussions, Ms Curiel-Llamazares for help with figures and Mr Espantaleón-Ágreda for excellent bibliographic support.

## Funding

This work was supported by Fundación Mutua Madrileña (FMM06/133), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and Instituto de Salud Carlos III (RD06/0003/0009 [REDINSCOR] and RD12/0042/0036 [RIC]).

## References

- Tabereaux PB, Dosdall DJ, Ideker RE. Mechanisms of VF maintenance: wandering wavelets, mother rotors, or foci. *Heart Rhythm* 2009;**6**:405–415.
- Samie FH, Berenfeld O, Anumonwo J, Mironov SF, Udassi S, Beaumont J et al. Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation. *Circ Res* 2001;**89**:1216–1223.
- Garfinkel A, Kim YH, Voroshilovsky O, Qu Z, Kil JR, Lee MH et al. Preventing ventricular fibrillation by flattening cardiac restitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:6061–6066.
- Li L, Jin Q, Huang J, Cheng KA, Ideker RE. Intramural foci during long duration fibrillation in the pig ventricle. *Circ Res* 2008;**102**:1256–1264.
- Ideker RE, Huang J. Our search for the porcine mother rotor. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2005;**10**:7–15.
- Kay MW, Walcott GP, Gladden JD, Melnick SB, Rogers JM. Lifetimes of epicardial rotors in panoramic optical maps of fibrillating swine ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;**291**:H1935–H1941.
- Moreno J, Zaitsev AV, Warren M, Berenfeld O, Kalifa J, Lucca E et al. Effect of remodelling, stretch and ischaemia on ventricular fibrillation frequency and dynamics in a heart failure model. *Cardiovasc Res* 2005;**65**:158–166.
- Rogers JM, Walcott GP, Gladden JD, Melnick SB, Ideker RE, Kay MW. Epicardial wavefronts arise from widely distributed transient sources during ventricular fibrillation in the isolated swine heart. *New J Phys* 2008;**10**:015004.
- Thomas SP, Thiagalingam A, Wallace E, Kovoor P, Ross DL. Organization of myocardial activation during ventricular fibrillation after myocardial infarction: evidence for sustained high-frequency sources. *Circulation* 2005;**112**:157–163.
- Warren M, Huizar JF, Shvedko AG, Zaitsev AV. Spatiotemporal relationship between intracellular  $Ca^{2+}$  dynamics and wave fragmentation during ventricular fibrillation in isolated blood-perfused pig hearts. *Circ Res* 2007;**101**:e90–101.
- Zaitsev AV, Guha PK, Sarmast F, Kolli A, Berenfeld O, Pertsov AM et al. Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circ Res* 2003;**92**:546–553.
- Nanthakumar K, Jalife J, Masse S, Downar E, Pop M, Asta J et al. Optical mapping of Langendorff-perfused human hearts: establishing a model for the study of ventricular fibrillation in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**293**:H875–H880.
- Nash MP, Mourad A, Clayton RH, Sutton PM, Bradley CP, Hayward M et al. Evidence for multiple mechanisms in human ventricular fibrillation. *Circulation* 2006;**114**:536–542.
- Nair K, Umapathy K, Farid T, Masse S, Mueller E, Sivanandan RV et al. Intramural activation during early human ventricular fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011;**4**:692–703.
- Hou L, Deo M, Furspan P, Pandit SV, Mironov S, Auerbach DS et al. A major role for HERG in determining frequency of reentry in neonatal rat ventricular myocyte monolayer. *Circ Res* 2010;**107**:1503–1511.
- Noujaim SF, Pandit SV, Berenfeld O, Vikstrom K, Cerrone M, Mironov S et al. Up-regulation of the inward rectifier  $K^+$  current ( $I_{K1}$ ) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol* 2007;**578**:315–326.
- Uchida T, Yashima M, Gotoh M, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN et al. Mechanism of acceleration of functional reentry in the ventricle: effects of ATP-sensitive potassium channel opener. *Circulation* 1999;**99**:704–712.
- Farid TA, Nair K, Masse S, Azam MA, Maguy A, Lai PF et al. Role of  $K_{ATP}$  channels in the maintenance of ventricular fibrillation in cardiomyopathic human hearts. *Circ Res* 2011;**109**:1309–1318.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:9–33.
- Such-Miquel L, Chorro FJ, Guerrero J, Trapero I, Brines L, Zarzoso M et al. Evaluation of the complexity of myocardial activation during ventricular fibrillation. An experimental study. *Rev Esp Cardiol* 2013;**66**:177–184.
- Berenfeld O, Mandapati R, Dixit S, Skanes AC, Chen J, Mansour M et al. Spatially distributed dominant excitation frequencies reveal hidden organization in atrial fibrillation in the Langendorff-perfused sheep heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;**11**:869–879.
- Bray MA, Wikswo JP. Considerations in phase plane analysis for nonstationary reentrant cardiac behavior. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2002;**65**:051902.
- Umapathy K, Masse S, Kolodziejka K, Veenhuyzen GD, Chauhan VS, Husain M et al. Electrogram fractionation in murine HL-1 atrial monolayer model. *Heart Rhythm* 2008;**5**:1029–1035.
- Sekar RB, Kizana E, Cho HC, Molitoris JM, Hesketh GG, Eaton BP et al.  $I_{K1}$  heterogeneity affects genesis and stability of spiral waves in cardiac myocyte monolayers. *Circ Res* 2009;**104**:355–364.
- Bingen BO, Askar SF, Schlij MJ, Kazbanov IV, Ypey DL, Panfilov AV et al. Prolongation of minimal action potential duration in sustained fibrillation decreases complexity by transient destabilization. *Cardiovasc Res* 2013;**97**:161–170.
- Stengl M. Experimental models of spontaneous ventricular arrhythmias and of sudden cardiac death. *Physiol Res* 2010;**59**:S25–S31.
- Bourgeois EB, Reeves HD, Walcott GP, Rogers JM. Panoramic optical mapping shows wavebreak at a consistent anatomical site at the onset of ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res* 2012;**93**:272–279.
- Feynman RP, Leighton RB, Sands M. *The Feynman Lectures on Physics*. Massachusetts, USA: Addison-Wesley Publishing Company; 1963.
- Jalife J, Gray R. Drifting vortices of electrical waves underlie ventricular fibrillation in the rabbit heart. *Acta Physiol Scand* 1996;**157**:123–131.

## ONLINE SUPPLEMENT

### EXPANDED METHODS

#### Isolated Heart Preparation and Optical Recordings

The present study was conducted in accordance with National (RD 1201/2005) and European (86/609/EEC) guidelines for the care and use of laboratory animals. Approval was granted by the local committee on animal welfare (Comité de Bienestar Animal, Hospital Clínico San Carlos). Eight Pietrain pigs (20-30 kg weight) were selected. Ketamine (20 mg/kg i.m.) was used for premedication. Surgical procedures were performed under general anesthesia induced with propofol (6 mg/kg i.v.) and atracurium besylate (0.2 mg/kg i.v.), and maintained with atracurium besylate (1.25 mg/kg/h i.v.), fentanyl (0.005 mg/kg/h i.v.) and isoflurane (2%). Mechanical ventilation was used during the whole procedure. ECG, expired CO<sub>2</sub>, pulse oximetry and rectal temperature were monitored to control the adequacy of anesthesia.

Hearts were exposed through a median sternotomy and VF was induced by a brief (1 second) application of 9V DC current, remote from the area where optical recordings would be taken.<sup>1-3</sup> Next, hearts were excised, placed in cold Tyrode's solution and rapidly connected to a Langendorff apparatus. Isolated hearts were perfused (37°C) with Tyrode's solution at flow rates allowing a mean perfusion pressure of 45-60 mmHg. Hearts were superfused with a warm (37°C) oxygenated Tyrode's solution (NaCl 130 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Glucose 5.6 mM, KCl 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM and albumin 0.04 g/l) as described elsewhere.<sup>4</sup> Newborn cardiac surgery oxygenators (Lilliput 1 D901, Dideco, Sorin Group, Italy) were used for Tyrode's warming and oxygenation (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Checking for actual Tyrode's pH, ionic and oxygen status was performed by direct sampling from a Langendorff side port during the experiment. Optical mapping recordings were performed at least 5 minutes after VF induction to allow steady state conditions to be attained.<sup>1, 2, 5</sup> Volume-conducted ECG and perfusion pressure were continuously monitored and registered (Prucka Cardiolab, General Electric).

Light from 2 tungsten-halogen lamps was collimated, filtered with band-pass emission optical filters (520±20 nm) and focused on the area of interest. Movies of Di-4-ANEPPS fluorescence changes were recorded at 300 frames/sec (1024 frames = 3.41 s) during VF, using a CCD camera (Dalsa Inc.; Ontario, Canada) with a 6-mm lens (DF6HA-1B Fujinon) and a long-pass emission filter (655 nm, Schneider-Kreuznach) connected via a frame grabber (RoadRunner 24, Bitflow Inc.) to a PC.<sup>6</sup> Sequential epochs were recorded while focusing on a square field of view with a ~25 mm side (range: 22-32 mm, 64×64 pixels) on the anterior LV, posterior LV, anterior RV and the posterior RV aspects in a random order. As the ventricles were fibrillating, there was no effective contraction. The minimal motion artifact or swing that there might have been was suppressed by gently compressing the heart against the inner surface of the superfusion chamber to adequately record each 3.41 s movie, so electromechanical un-couplers were not required.

Five movies were recorded at each 1 of the 4 anatomical sites under baseline conditions. The results from these 5 movies were averaged (baseline results). The same protocol was then repeated in the 8 hearts in the presence of a new Tyrode's solution with 10  $\mu\text{M}$  cromakalim (CK),<sup>7</sup> which activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels.<sup>8,9</sup> In animals #3 to #8, an additional set of movies per region was taken during the CK stage to check if the accelerated VF pattern was stationary or varied with time. The additional set of movies was filmed 5-22 minutes after the completion of the first set. We used anatomical landmarks as reference to ensure that we were always filming the activity in the same 4 anatomical areas. Thus, in the 2 first hearts, 2 sets of movies were recorded (baseline-VF and CK-VF). In each set, 4 anatomical regions were filmed randomly (anterior LV, posterior LV, anterior RV and posterior RV). In each anatomical region, 5 movies of 3.41 s were acquired, analyzed, and their results averaged. Thus, a total of  $2 \times 2 \times 4 \times 5 = 80$  movies were analyzed from the first 2 hearts. From heart #3 to #8, an additional set was recorded (1 in baseline-VF and 2 in CK-VF, as shown in **Table 1** and **Figure 3E**). In each set, 4 anatomical regions were filmed randomly, and, in each region, 5 movies of 3.41 s were acquired. Thus, a total of  $6 \times 3 \times 4 \times 5 = 360$  movies were analyzed from the last 6 hearts. Therefore, a total of  $80 + 360 = 440$  VF movies were analyzed.

### Spectral Analysis of VF epochs

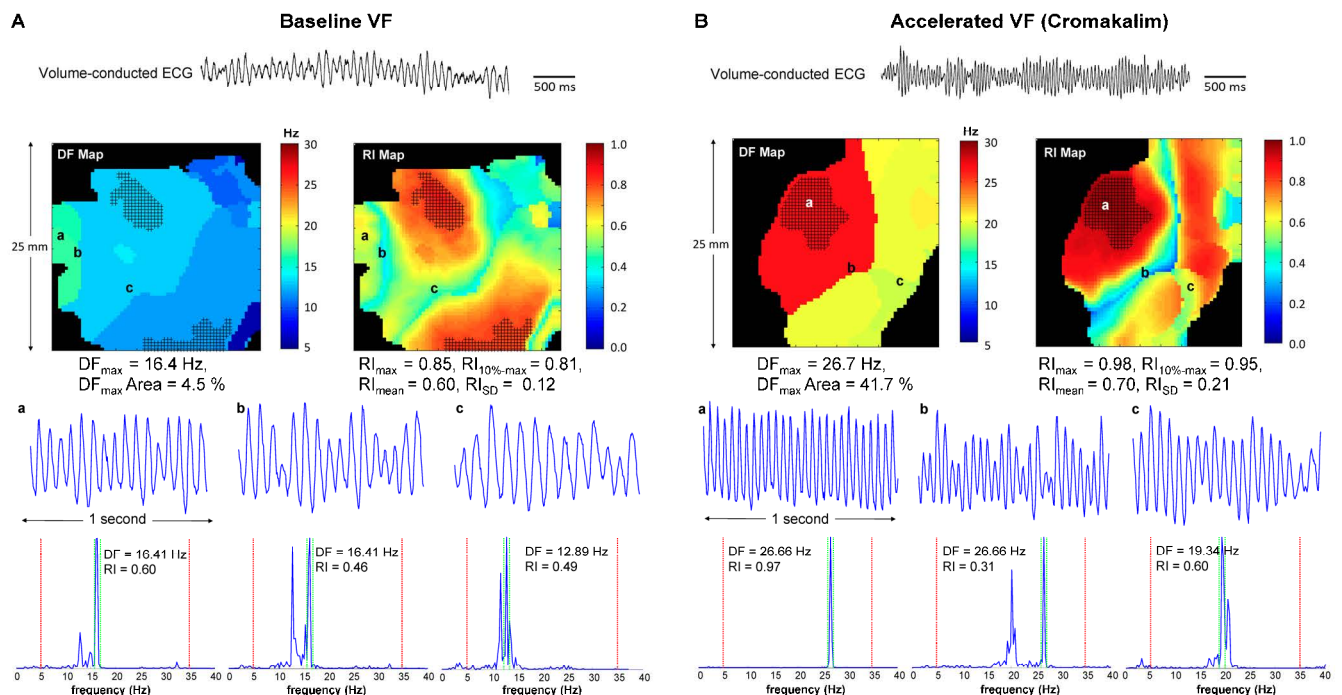
Previous publications have described dominant frequency mapping.<sup>10, 11</sup> After time filtering (median filter, 3 frames), low pass space filtering (convolution with a pyramid-shaped kernel, 3x3 pixels), and removal of drift when present (subtraction of the output of a running average filter),<sup>1</sup> automatic masking of border areas with a poor signal to noise ratio was performed. Spectral analyses of the 3.41 s of the temporal fluorescence signals at  $(x,y)$  position,  $F(x,y,t)$ , were performed on their one-sided power spectral density,  $PSD(x,y,f)$ , which was obtained with a fast Fourier transformation<sup>12</sup> with 1024 samples (" $f$ " denotes frequency in Hz, spectral resolution = 0.29 Hz) using Matlab (Mathworks Inc., Natwick, USA). A dominant frequency (DF) corresponding to the highest peak in the power spectral density,  $PSD(x,y,f)$ , in the range of 5 to 35 Hz was determined for the fluorescence signal at each position  $(x,y)$ . The DFs of all unmasked pixels were used to generate a DF map of the field of view for each movie,  $DF(x,y)$ . From DF maps, we determined the maximum dominant frequency (highest DF value observed,  $DF_{max} = \max[DF(x,y)]$ ) and the percentage of the total unmasked filmed area activating at the maximum DF in each region.

The power spectrum was also used to quantify the aperiodic complexity of the signals using the regularity index (RI).<sup>11</sup> This index is based on the fact that the most pure signal in the frequency domain is a sinusoidal with infinite duration, which should have a single spectral line (Dirac delta, no spectral width).<sup>13</sup> Since the analyzed signals do not have an infinite duration, even the spectrum calculated from a sinusoid will have some width due to "temporal windowing" produced by their limited length.<sup>13</sup> This is why a certain frequency margin around the peak frequency is considered when RI is calculated. Other works using intracavitary electrograms in

the atria have used another index (organization index, OI) which takes into account the successive harmonics of the fundamental frequency.<sup>14</sup> This is not required when working with optical action potentials since important harmonics are not usually found in their spectra,<sup>15</sup> as shown in **Supplementary Figure S1**. Thus, we defined RI as the ratio of the power at the  $DF \pm 0.58$  Hz (enclosed area between the green dotted lines in spectra from **Supplementary Figure S1**) to the total power in the range of 5 to 35 Hz (enclosed area between the red lines in spectra from **Supplementary Figure S1**). RI of the signals from the whole unmasked field of view was automatically determined, according to the calculation:

$$RI(x, y) = \frac{\int_{DF(x,y)-0.58}^{DF(x,y)+0.58} PSD(x, y, f) df}{\int_5^{35} PSD(x, y, f) df}$$

These values were represented as RI maps. The mean of all the RI values from each RI map ( $RI_{\text{mean}}$ ) and its standard deviation ( $RI_{\text{SD}}$ ) were calculated. The maximum RI in each anatomical area was obtained from the pixel/s with the highest spectral and periodic organization ( $RI_{\text{max}}$ ). To prevent spurious values of maximum RI from confounding interpretations about organization, the mean value for the 10% most organized pixels ( $RI_{10\%-\text{max}}$ ) was also calculated.



**Supplementary Figure S1.** Example of spectral analysis. Panels A (Baseline VF) and B (Accelerated VF, Cromakalim) display ECG, and DF-RI maps from the posterior RV in heart #3. Optical recordings and spectra from points a, b and c at their respective DF-RI maps are shown below. Although only 1 second is displayed for clarity, all spectra were calculated using the whole movie length (3.41 s, 1024 frames). At the spectra, green and red lines enclose the areas used to calculate RI. Shaded areas on maps correspond to pixels in the top 10% RI values.



## Analysis of Phase Singularities and Rotor Tracking

Phase movies were obtained from the previously filtered movies by means of Hilbert transformation of the optical action potentials.<sup>1, 16</sup> Phase singularity (PS) was defined as a point where all phases converge. Phase movies and PS detection were performed using custom-made software (Scroll software, Dr. Sergey Mironov, Center for Arrhythmia Research, University of Michigan, Ann Arbor).

Unfortunately, PS tracking algorithms are fraught with technical difficulties and may falsely interpret a single long-standing PS as several different PS of shorter durations due to losses in PS detection in short time intervals, as shown in **Supplementary Figure S2A**. To avoid this limitation, we used Matlab (Mathworks Inc., Natwick, USA) to implement a custom tracking algorithm based on "clustering" (J.G. Quintanilla). To summarize, the PS spatial coordinates were plotted over time, thus, each PS was assigned with its own coordinates (x, y, t) in a 3-dimensional space. A maximum spatial ( $\Delta d_{\max}$ ) and temporal separation ( $\Delta t_{\max}$ ) between detected PS to be considered as belonging to the same cluster was set. Since the Euclidean distance in the described 3-dimensional space is not the same in spatial axes ( $\sim 25\text{mm}/64 \text{ pixels} = \sim 0.39 \text{ mm/pixel}$ ) compared to the temporal axis (300 fps: 3.3 ms between frames), we applied a scaling process in both spatial (x, y) and temporal axes (t) to make  $\Delta d_{\max}$  and  $\Delta t_{\max}$  match to a normalized Euclidean distance of 1. By scaling, new coordinates ( $x_s, y_s, t_s$ ) were assigned to each PS. Then, a clustering method based on Euclidean distance between points was performed. Two PS with normalized Euclidean distance less than or equal to 1 are considered to belong to the same cluster; otherwise, they were considered to belong to different clusters. The  $\Delta d_{\max}$  and  $\Delta t_{\max}$  parameters were properly optimized after intense testing with both short and long-standing rotors in different experimental situations. The same  $\Delta d_{\max}$  and  $\Delta t_{\max}$  values were used in the analysis of all VF epochs. As a result of the tracking algorithm implementation, analysis of PS was more accurate and robust against losses of detection in short periods of time, especially for tracking long-standing rotors, as shown in **Supplementary Figure S2B**. Once the clustering was performed, visually inspected and corrected if necessary, a starting point of a clustered PS trajectory was considered to be the site of a new wavebreak and its endpoint the last site of PS detection.<sup>2</sup> PS lifespan was obtained for each PS as the temporal difference between these two temporal points.

A PS lasting  $\geq 1$  rotation was considered a rotor. The number of rotations around the rotor's own core was calculated for each PS as its life span (in seconds) divided by the most predominant DF (in Hz) in the area in which the detected PS was moving (mode DF of the pixels swept by the rotor core). In addition, the area enclosed by the PS in each one of its complete rotations after spatial morphologic operations (spur detections removal, closing and filling) was estimated. Then, the rotor core area was estimated by a trimmed-mean of these areas (bilateral 10% to avoid spurious estimates), as shown in **Figure 1E**.

The spatial location of a rotor during one rotation was calculated as the centroid of the core area in that rotation. The rotor trajectory was obtained by joining the centroids of each full rotation. Drifting velocity (mm/s) of each moving rotor was obtained by dividing the rotor spatial drifting trajectory (the projection in the x-y plane of the solid lines in **Figure 5** and **6**) by its lifespan. For each VF epoch analyzed, we calculated the density of rotors (defined as number of rotors arising per time and surface unit, in rotors/cm<sup>2</sup>·s), density of rotors lasting ≥200 ms,<sup>17</sup> rotor maximum lifespan (in ms) and mean core area (in mm<sup>2</sup>).

We defined “persistent rotors” as those lasting more than an entire movie (≥3.41 s, over 90 revolutions in most CK cases), “local leading rotors” as the persistent ones found in the local highest frequency domain in each anatomical area filmed, and “global leading rotors” as the persistent ones found in the domain with the highest frequency among the four regions filmed in each set.

### Pseudo Bipolar Electrograms

To test the correlation between complex fractionated activity and rotors, pseudo bipolar electrograms (PBE) were obtained. Pseudo unipolar electrograms (PUE), from both distal and proximal catheter electrodes, were derived adding the fluorescence level (F) of all the pixels in the simulated electrode, as follows (**Supplementary Figure S2C**):

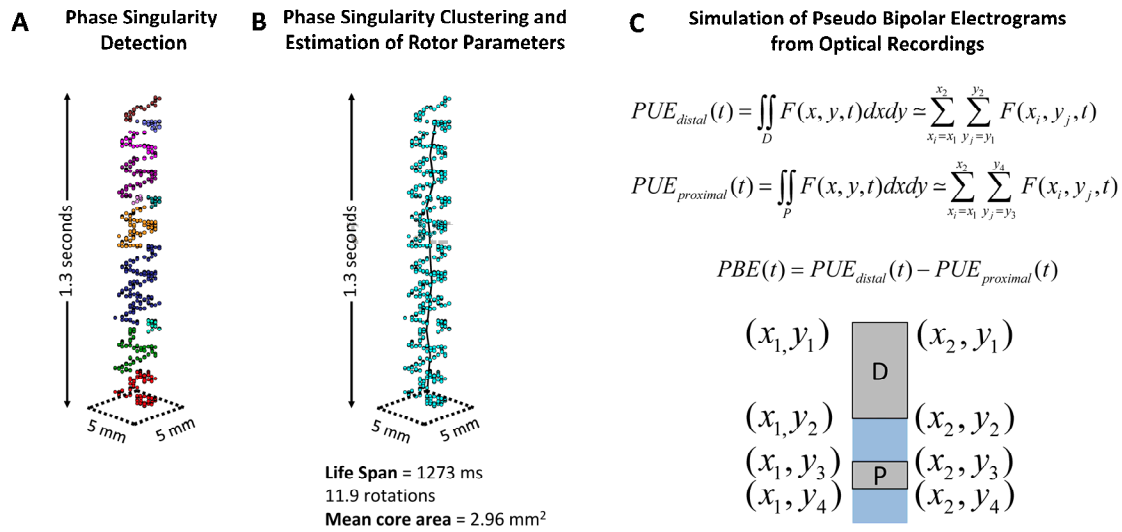
$$PUE_{distal}(t) = \iint_D F(x, y, t) dx dy \approx \sum_{x_i=x_1}^{x_2} \sum_{y_j=y_1}^{y_2} F(x_i, y_j, t)$$

$$PUE_{proximal}(t) = \iint_P F(x, y, t) dx dy \approx \sum_{x_i=x_1}^{x_2} \sum_{y_j=y_3}^{y_4} F(x_i, y_j, t)$$

Finally, PBE was calculated using the following equation:

$$PBE(t) = PUE_{distal}(t) - PUE_{proximal}(t)$$

These PBE simulate the signals obtained with the distal dipole of: (1) a typical ablation catheter (3.5-2-1 mm), (2) a typical circular catheter (1-6-1 mm), and (3) a high resolution diagnostic catheter (0.75-1-0.75 mm), taking into account their electrode sizes and inter-dipole separations, as shown in **Figure 1F**.



**Supplementary Figure S2. A. Phase singularity detection.** Three-dimensional (x,y,t) representation of a phase singularity (PS) detected in the phase movie shown in figure 1C. The PS trajectory clearly corresponds to a long standing rotor in the centre of field of view (dotted black square). “Classic” tracking algorithms fix a certain spatial tolerance between a PS position in one frame and the next, but they are not robust against loss of detection in small time intervals. These algorithms may fragment a single long standing rotor in several groups of PS of shorter life span, some of them even not reaching a full rotation. In this panel, PS with different colours represent the different groups of PS in which the rotor is fragmented with a classical tracking algorithm based on space overlapping between a frame and the next, which leads to wrong conclusions about rotor stability due to detection losses in some short time intervals. **B. Phase singularity clustering and estimation of rotor parameters.** Phase Singularity (PS) positions (light blue points) and rotor core trajectory (solid line as projected over x-y plane) in the same long standing rotor after clustering. It can be observed how all PS belonging to the rotor are classified in an only cluster, and thus, as an only long-standing rotor. This approach allows a more accurate estimation of rotor parameters such as life span, number of rotations and core area. **C. Simulation of pseudo bipolar electrograms from optical recordings.** The equations used to obtain the pseudo-unipolar electrograms (PUE) are shown. Pseudo-bipolar electrograms (PBE) are obtained by subtracting the proximal from the distal PUE.  $F(x,y,t)$  is the fluorescence intensity in a pixel with coordinates (x,y) at the instant  $t$ .

## Statistical Analysis

After testing for normality with the Shapiro-Wilk’s test, repeated measures ANOVA was used to test for significant differences. Wilcoxon’s and Friedman’s tests (non-parametric, paired) were used when distributions differed significantly from Gaussian. Continuous variables are generally expressed in text as mean±SD and displayed by Tuckey’s box plots. Boxes represent the median (thick line) and interquartile range (Median [P<sub>25%</sub>-P<sub>75%</sub>]). Whiskers show the minimum and maximum values, except when an outlier value is found, which is depicted as a point.<sup>18</sup> Mean is displayed as ‘+’. Accelerated VF (CK) values were averaged from the 2 set of movies when both existed, since significant differences between them were not found. Maximum lifespan was

calculated as the longest duration of a rotor considering the two sets of movies when both existed. Categorical variables (existence of persistent rotors or presence of persistent rotors in the fastest domain [yes/no]) were compared among different anatomical areas using Fisher's exact test since the expected values were usually less than 5 and the conditions to use the simpler Chi-squared test were not fulfilled. Linear regression was performed to test the relation between rate of drifting rotors and their drifting velocity with inter-domain frequency gradients. A two-tailed  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## SUPPLEMENTARY RESULTS

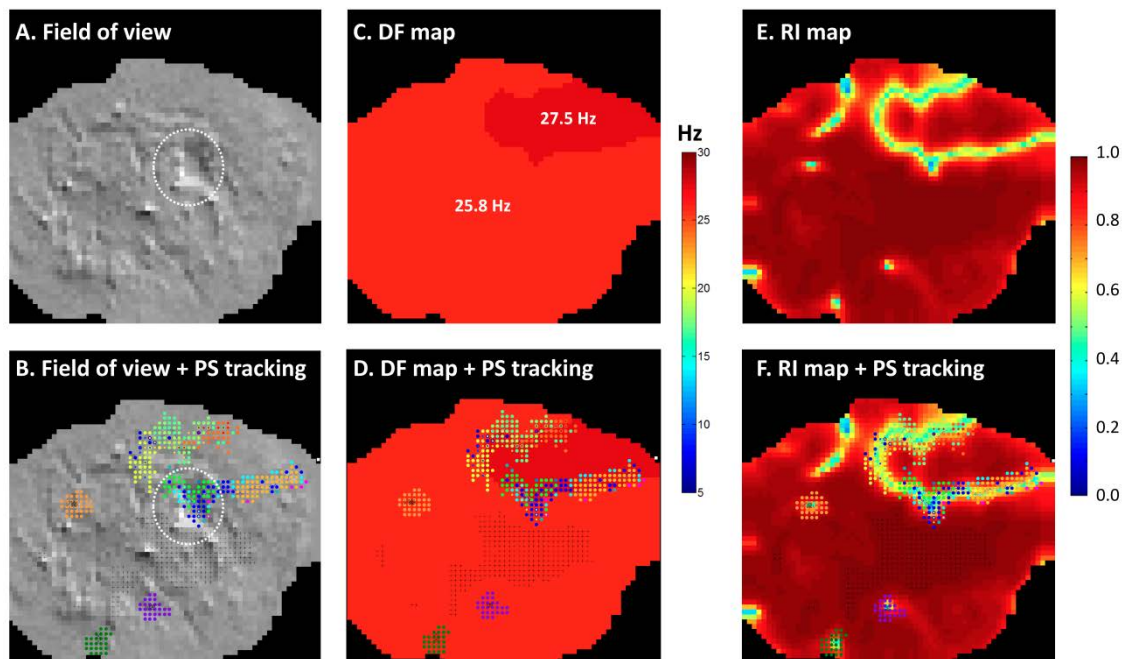
### Do anatomical obstacles have a major influence on quasi-periodical drifting in CK-accelerated VF?

**Supplementary Figure S3** shows a view of the anterior RV in heart #1 where both persistent stationary rotors and quasi-periodical drifting rotors were observed (**Figure 6B**,  $t=0$  panel). Panel A shows an anatomical image of the field of view, showing some irregularities on the epicardium. A dotted white circle marks an area with an anatomical irregularity that might act as an obstacle difficult for epicardial drifting rotors to overcome. Panel B shows the same image in A with superimposed phase singularities. The orange, dark green, and purple "circular" clusters of points show the position of the pivoting phase singularities in the 3 persistent epicardial rotors. The remaining colored clusters of points at the upper right corner display the periodical drifting rotors observed over the inter-domain borders. Two families of periodical drifting rotors appeared, the first family over the superior inter-domain border, and the second family (the only one displayed in (x,y,t) views in **Figures 5B** and **6A** for clarity) over the inferior inter-domain border.

We are uncertain where these drifting rotors were initiated, since they appeared at the image border. Signal to noise ratio is usually low in borders due to the lower level of excitation light. In addition, there might be some issues related to spatial filtering in the image borders. Nevertheless, an anatomical irregularity marked in A with a dotted white circle might have brought drifting trajectories to an end (see **Supplementary Movie 2**).

**Supplementary Figure S3C** shows the DF map of this episode with 2 very rapid domains. Phase singularities appear superimposed in panel D. Three persistent rotors can be seen in the slowest domain. Also, it is clear how the periodical rotors drifted over the frontier between the two very rapid domains. Panel E shows the Regularity Index (RI) map. Most of the pixels in the movie reached very high RI values (close to 1 as shown by the red shades in RI maps). The areas with the cores of the stationary rotors showed lower RI values due to the minimal amplitudes of optical signals in these cores. The inter-domain border also showed low RI values, in this case due to the existence of two clear spectral peaks from the interspersed

domains (as shown in **Figure 6B**, rightmost panel). In panel F, phase singularities are superimposed over the same RI map in E.

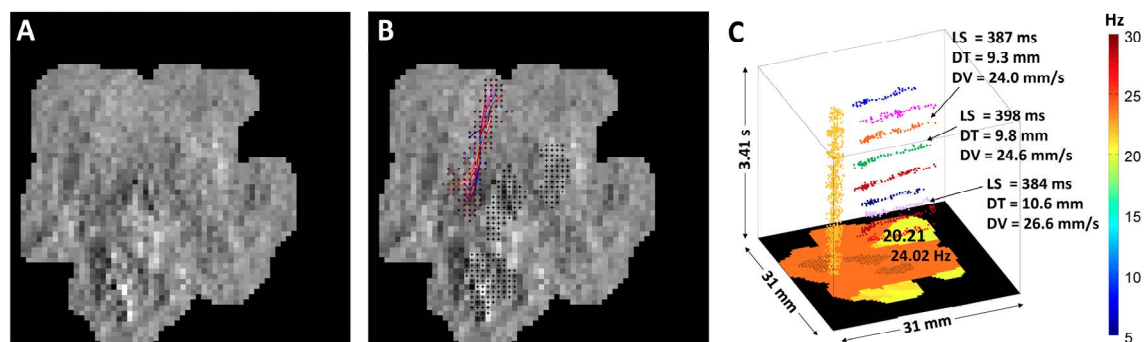


**Supplementary Figure S3.** Field of view of the anterior RV in heart #1. Shaded areas correspond to pixels with the top 10% RI values. **A.** Anatomical image of the field of view. A dotted white circle marks an area with an anatomical irregularity which might have brought drifting trajectories to an end. **B.** Same image in A with phase singularities (PS) superimposed. **C.** Dominant Frequency (DF) map. **D.** Same DF map in C with phase singularities superimposed. **E.** Regularity Index (RI) map. **F.** Same RI map in E with phase singularities superimposed.

As previously reviewed by others,<sup>19</sup> the theory of excitable media predicts that drift may be the result of spatial gradients in certain parameters (fiber orientation, action potential duration, activation frequency etc.). Even in the healthy myocardium, fiber orientation, refractoriness and excitability are non-uniform, which allow rotors to drift.

In our experiments in accelerated VF, we have found a strong relation between the rate of appearance of the quasi-periodical drifting rotors and their drifting velocity with the inter-domain spatial frequency gradient. This fact highlights the functional more than anatomical nature of this drifting, although anatomical obstacles (vessels, scars, small fibrotic islets etc.) may play a role in their initiation, trajectory and termination. Most of the anatomical images from the areas in which these quasi-periodical drifting rotors were found, did not show vessels or other important anatomical barriers or obstacles demarcating the borders at which these rotors drifted, although epicardial tissue heterogeneities seemed to be the starting point of drifting in some episodes (an example is shown in **Supplementary Figure S4** and **Supplementary Movie S3**). Additionally, this example can also be used to illustrate the higher drifting velocities reached when inter-domain frequency gradients are large (slightly lower than 4 Hz in this example).

Therefore, anatomical barriers, obstacles or tissue heterogeneities did not seem to have a major influence over the trajectories described by the quasi-periodical drifting rotors found in our experiments, but they may have been related to the starting point of their drifting. Additionally, the absolute density and heterogeneity of  $K^+$  inward-rectifier currents may have an important effect on these drifting paths and anchoring sites as previously shown by others in monolayers.<sup>20</sup> In our experiments in accelerated VF, once the drifting rotor appeared, its drifting trajectory coincided with the border between areas being activated at different frequencies (inter-domain spatial DF gradient).



**Supplementary Figure S4.** Field of view of the anterior LV in heart #2. Shaded areas on DF and RI maps correspond to pixels with the top 10% RI values. **A.** Anatomical image of the field of view. **B.** Same image in A with phase singularities corresponding to quasi-periodical drifting rotors superimposed. The drifting paths do not seem to match any vessel or anatomical irregularity, although an epicardial heterogeneity seemed to be the starting point of the quasi-periodical drifting rotors. **C.** (x,y,t) view of the dominant frequency (DF) map from this movie. Only the persistent rotor (in light orange) and the quasi-periodical drifting rotors (randomly coloured) sweeping the inter-domain border have been displayed for clarity. Note the drifting rotors as they appeared quasi-periodically over the inter-domain border. Their drifting velocities are high since a large inter-domain frequency gradient was involved. LS: Lifespan, DT: drifting trajectory, DV: drifting velocity.

## Supplementary Movies

**Supplementary movie S1 (10x slower).** Persistent epicardial global leading rotors at the posterior LV maintaining the fastest domain in heart #3 (**Figure 4**). No other epicardial persistent rotors were found in this heart. The upper epicardial rotor remained active when the last movie focused on the posterior LV was filmed in the first set of movies in this heart (set “a”), lasting at least 1 minute (over 1780 revolutions).

**Supplementary movie S2 (10x slower).** This movie shows an example of two highly organized domains as shown in **Figure 5B** (t=0 panel) and **6A**. The slowest and larger domain (25.8 Hz) was sustained temporarily by 3 persistent but not leading rotors. The left superior stationary rotor in the slowest domain lasted over 33.41 seconds (860 rotations) and eventually terminated, probably due to wavefront collision from the adjacent highest frequency domain (upper right

corner of the field of view, 27.5Hz). In addition, an example of “beat phenomenon” is shown as drifting rotors appeared quasi-periodically over the inter-domain border. Since the inter-domain frequency gradient is relatively low (1.7 Hz), these rotors drifted rather slowly (~11 mm/s on average).

**Supplementary movie S3 (10x slower).** This movie shows the anterior LV in heart #2 (set a, **Supplementary Figure S4**). Rotors appeared on an inter-domain border with a quasi-periodical drifting behavior. This border did not match any vessel or epicardial obstacle, but some epicardial tissue heterogeneities seemed to be the starting point of drifting. Since the inter-domain frequency gradient in this example is higher than in the previous example (~4 Hz), the drifting rotors appeared more frequently (higher  $f_{beat}$ ) and drifted faster (~26 mm/s on average).

## References

1. Warren M, Huizar JF, Shvedko AG, Zaitsev AV. Spatiotemporal relationship between intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics and wave fragmentation during ventricular fibrillation in isolated blood-perfused pig hearts. *Circ Res* 2007;**101**:e90-101.
2. Zaitsev AV, Guha PK, Sarmast F, Kolli A, Berenfeld O, Pertsov AM, de G, Jr., Coronel R, Jalife J. Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circ Res* 2003;**92**:546-53.
3. Li L, Jin Q, Huang J, Cheng KA, Ideker RE. Intramural foci during long duration fibrillation in the pig ventricle. *Circ Res* 2008;**102**:1256-64.
4. Moreno J, Quintanilla JG, López-Farré A, Archondo T, Cervigón R, Aragoncillo P, Usandizaga E, Rodríguez-Bobada C, Rojo JL, Pérez-Castellano N, Mironov S, Mont L, Pérez de PT, Macaya C, Pérez-Villacastín J. Skeletal myoblast implants induce minor propagation delays, but do not promote arrhythmias in the normal swine heart. *Europace* 2010;**12**:1637-44.
5. Such-Miquel L, Chorro FJ, Guerrero J, Trapero I, Brines L, Zarzoso M, Parra G, Soler C, Del C, I, Alberola A, Such L. Evaluation of the Complexity of Myocardial Activation During Ventricular Fibrillation. An Experimental Study. *Rev Esp Cardiol* 2013;**66**:177-184.
6. Moreno J, Zaitsev AV, Warren M, Berenfeld O, Kalifa J, Lucca E, Mironov S, Guha P, Jalife J. Effect of remodelling, stretch and ischaemia on ventricular fibrillation frequency and dynamics in a heart failure model. *Cardiovascular research* 2005;**65**:158-166.
7. Uchida T, Yashima M, Gotoh M, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN, Fishbein MC, Mandel WJ, Chen PS, Karagueuzian HS. Mechanism of acceleration of functional reentry in the

- ventricle: effects of ATP-sensitive potassium channel opener. *Circulation* 1999;**99**:704-712.
8. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovascular research* 2004;**62**:9-33.
  9. Venkatesh N, Stuart JS, Lamp ST, Alexander LD, Weiss JN. Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by cromakalim. Effects on cellular K<sup>+</sup> loss and cardiac function in ischemic and reperfused mammalian ventricle. *Circ Res* 1992;**71**:1324-1333.
  10. Berenfeld O, Mandapati R, Dixit S, Skanes AC, Chen J, Mansour M, Jalife J. Spatially distributed dominant excitation frequencies reveal hidden organization in atrial fibrillation in the Langendorff-perfused sheep heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;**11**:869-879.
  11. Zaitsev AV, Berenfeld O, Mironov SF, Jalife J, Pertsov AM. Distribution of excitation frequencies on the epicardial and endocardial surfaces of fibrillating ventricular wall of the sheep heart. *Circ Res* 2000;**86**:408-417.
  12. Cooley JW, Tuckey JW. An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Math Comput* 1965;**19**:297-301.
  13. Oppenheim AV, Willsky AS, Young IT. Signals and Systems. Prentice-Hall; 1983.
  14. Everett TH, Kok LC, Vaughn RH, Moorman JR, Haines DE. Frequency domain algorithm for quantifying atrial fibrillation organization to increase defibrillation efficacy. *IEEE Trans Biomed Eng* 2001;**48**:969-978.
  15. Fischer G, Hintringer F. Letter regarding article by Sanders et al, "spectral analysis identifies sites of high-frequency activity maintaining atrial fibrillation in humans". *Circulation* 2006;**113**:e44.
  16. Bray MA, Wikswo JP. Considerations in phase plane analysis for nonstationary reentrant cardiac behavior. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2002;**65**:051902.
  17. Kay MW, Walcott GP, Gladden JD, Melnick SB, Rogers JM. Lifetimes of epicardial rotors in panoramic optical maps of fibrillating swine ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;**291**:H1935-H1941.
  18. Tukey JW. Exploratory data analysis. Reading, MA 1977.
  19. Samie FH, Jalife J. Mechanisms underlying ventricular tachycardia and its transition to ventricular fibrillation in the structurally normal heart. *Cardiovasc Res* 2001;**50**:242-250.



20. Sekar RB, Kizana E, Cho HC, Molitoris JM, Hesketh GG, Eaton BP, Marban E, Tung L.  $I_{K1}$  heterogeneity affects genesis and stability of spiral waves in cardiac myocyte monolayers. *Circ Res* 2009;**104**:355-364.







## Capítulo 5

**Mechanistic approaches  
to detect, target and  
ablate the drivers of  
atrial fibrillation**

*Circ Arrhythm Electrophysiol* 2016 Jan



## Mechanistic Approaches to Detect, Target, and Ablate the Drivers of Atrial Fibrillation

Jorge G. Quintanilla, MEng; Julián Pérez-Villacastín, MD, PhD;  
Nicasio Pérez-Castellano, MD, PhD; Sandeep V. Pandit, PhD; Omer Berenfeld, PhD;  
José Jalife, MD; David Filgueiras-Rama, MD, PhD

Ablation strategies to treat atrial fibrillation (AF) have evolved from the initial focal pulmonary vein ablation approach of Haïssaguerre et al<sup>1</sup> to new technical developments aimed at simplifying the procedure and increasing its safety.<sup>2</sup> However, ablation procedures are still associated with unsatisfactory rates of long-term success, particularly in persistent and long-term AF.<sup>3</sup> We submit that such disappointing outcomes are the result of the intrinsic limitations of a strategy that has relied mainly on anatomic landmarks during the past 2 decades, and paid scant attention to the underlying mechanisms of the arrhythmia.

Recently, approaches aimed at localizing and targeting AF sources based on careful analysis of the fibrillatory patterns often obtained via multiple electrode mapping systems (basket-catheter mapping, body surface mapping, and electrocardiographic imaging [ECGI]) have resulted in an increased specificity of ablation procedures, and long-term freedom from AF.<sup>4-7</sup> Such mechanistically based ablation techniques have the potential to enable translational insights from experimental animal models into further improved AF ablation therapy. Indeed, they are a direct result of insights into the dynamic behavior of AF drivers, obtained from experimental optical mapping studies and computer simulations of AF dynamics.

The purpose of this article is to briefly review the following: (1) competing theories attempting to explain mechanisms underlying AF maintenance, (2) different methodologies to map electric activity during AF, (3) the most recent mechanistic ablation approaches aimed at targeting AF drivers and their outcomes, and (4) the controversies and near-future directions in the quest to increase the understanding of AF mechanisms and improve ablation outcomes.

### Mechanisms Underlying AF Maintenance

#### *Historical Perspective: Reentry, Ectopic Foci, Random Wavelets, Complex Fractionated Atrial Electrograms, and Endo-Epicardial Breakthroughs*

AF mechanisms have a long history of controversy.<sup>8</sup> During the first half of the 20th century, 2 theories were prevalent: the concept of reentry around an anatomic obstacle (circuit

movement reentry),<sup>9</sup> and the ectopic focus theory.<sup>10</sup> Focus isolation in the latter terminated the arrhythmia.<sup>10</sup> In 1959, Moe and Abildskov<sup>11</sup> postulated that fibrillation was sustained by multiple independent, electric wavelets propagating randomly throughout the atria. Clinical support for this hypothesis seemed to come from the Maze procedure, a surgical procedure that effectively creates an electric maze in the atrium, allowing sinus impulses to activate the entire atrial myocardium and AV node, but disallowing maintenance of the randomly propagating wavelets that, allegedly, would sustain AF.<sup>12</sup> Importantly, this procedure isolated the pulmonary veins that were later recognized as important triggers of AF.<sup>1</sup>

In 1977, Allesie et al<sup>13</sup> described the concept of functional reentry via the leading-circle hypothesis. Years later, leading-circle reentry was observed during pacing-induced AF in humans,<sup>14</sup> and both foci and reentrant mechanisms were found during cardiac surgery in patients with permanent AF and mitral valve disease.<sup>15</sup>

A decade ago, Nademanee et al<sup>16</sup> proposed that areas with complex fractionated atrial electrograms (CFAEs) may be critical for maintaining AF and their ablation might result in better clinical outcomes. CFAEs were described as fractionated or continuous electric activity at short cycle lengths.<sup>16</sup> CFAEs may colocalize with potential drivers of AF (rotor cores).<sup>17</sup> However, most CFAEs are passive, consequence of fibrillatory conduction, wavefront collision, drifting/acceleration of rotors,<sup>18</sup> fibrosis,<sup>19</sup> or might be even considered an artifact of the bipolar recording methodology because they are a function of the interelectrode distance.<sup>20</sup>

More recently, the so-called double-layer hypothesis based on high-density atrial data has been put forth,<sup>21</sup> suggesting that persistent AF is maintained by endo-epicardial breakthroughs acting as randomly distributed multiplication sites of fibrillation waves. Such breakthroughs are envisioned to continuously generate new breakthroughs emerging at the contralateral layer, sometimes annihilating other preexistent waves in the new layer.<sup>21</sup> A double-layer mechanism of persistent AF would have important practical consequences because it would make

Received March 24, 2015; accepted August 18, 2015.

From the Advanced Development in Arrhythmia Mechanisms and Therapy Laboratory, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, Spain (J.G.Q., J.J., D.F.R.); Arrhythmia Unit, Cardiovascular Institute, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain (J.G.Q., J.P.V., N.P.C., D.F.R.); and Center for Arrhythmia Research, Department of Internal Medicine-Cardiology, University of Michigan, Ann Arbor (S.V.P., O.B., J.J.).

Correspondence to José Jalife, MD, Center for Arrhythmia Research, University of Michigan, 2800 Plymouth Rd, Ann Arbor, MI 48109. E-mail [jjalife@med.umich.edu](mailto:jjalife@med.umich.edu)

(*Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;9:e002481. DOI: 10.1161/CIRCEP.115.002481.)

© 2015 American Heart Association, Inc.

*Circ Arrhythm Electrophysiol* is available at <http://circep.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCEP.115.002481

it impossible for a limited ablation to successfully restore sinus rhythm.<sup>21</sup> However, it has been reported that acute termination of AF can be achieved after ablation at specific target sites in most patients with paroxysmal and persistent AF,<sup>4,7,22</sup> which supports the idea of driving sources underlying AF.

### ***Rotors and Scroll Waves***

The use of voltage-sensitive probes and high-resolution video imaging in isolated animal hearts has provided support for the hypothesis that AF may be driven by one or a small number of high-frequency rotors.<sup>23–29</sup> Rotors are 3-dimensional (3D) electric objects (scroll waves) but current technical limitations restrict their detection to 2 dimensions (Figure 1A) either from the epicardial or from the endocardial surface. In theory, a typical scroll wave rotates around a linear I-shaped filament (Figure 1B) that spans the atrial wall, although filaments may also acquire more complex shapes (L shape, U shape, and O shape).<sup>30</sup> Often, one can only observe indirect footprints of scroll waves in the form of breakthrough patterns resembling focal activation.<sup>23</sup> In addition, the true drivers that maintain AF are those with the highest rotation frequency, and whose domain of 1:1 activation is the narrowest, which makes it extremely difficult to find them even at the highest spatiotemporal resolution provided by optical mapping. The waves generated by such rotors propagate through the cardiac muscle and interact with anatomic and functional obstacles leading to fibrillatory conduction, fragmentation, and new wavelet formation.<sup>31</sup> Narayan et al<sup>7</sup> have recently reported evidence of stable rotors in human patients with either paroxysmal, persistent, or long-lasting AF. Haissaguerre et al<sup>6</sup> have also recently reported that 80% of the drivers during persistent AF were reentrant. Most rotors and focal breakthroughs colocalized and ≈70% of them were in the left atrium (Figure 1C). Therefore, not only experimental but also growing clinical evidence indicates that rotors can be key players in AF maintenance.

## **Mapping Methods to Localize Sources and Understand AF Dynamics**

### ***Spectral Analysis and Phase Mapping***

Both spectral analysis and phase mapping of cardiac potentials can be applied to any of the approaches described in the next subsections. Both algorithms derive originally from optical mapping experiments conducted in isolated hearts.<sup>23,32</sup>

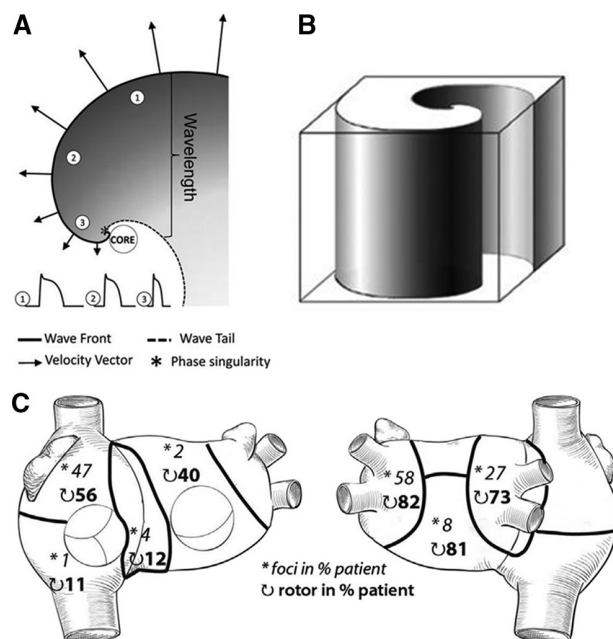
Spectral analysis is used to map the distribution of AF frequencies and localize the areas with the highest activation frequencies (ie, the shortest cycle lengths),<sup>23</sup> which usually coincide with the location of AF sources (foci or rotors) that maintain AF.<sup>4,5</sup> A good tutorial for clinicians on spectral analysis of AF electrograms may be found elsewhere.<sup>33</sup> Briefly, the spectrum of a signal displays its energy/power distribution in the frequency domain. The frequency of the highest peak in the spectrum at 1 location is called dominant frequency (DF), which is often used as a surrogate for the average activation rate (ie, the inverse of the cycle length) at that location (Figure 2A).<sup>33</sup> Spectral analysis becomes particularly useful when the activation rate is difficult to measure in the time domain, as may happen during AF. Figure 2B and 2C illustrates examples of DF maps obtained during optically mapped

AF, where areas of maximum DF ( $DF_{max}$ ) thought to drive the fibrillation process are displayed. These areas are surrounded by others that are incapable of activating at such exceedingly high frequencies and depict fibrillatory conduction.<sup>31</sup>

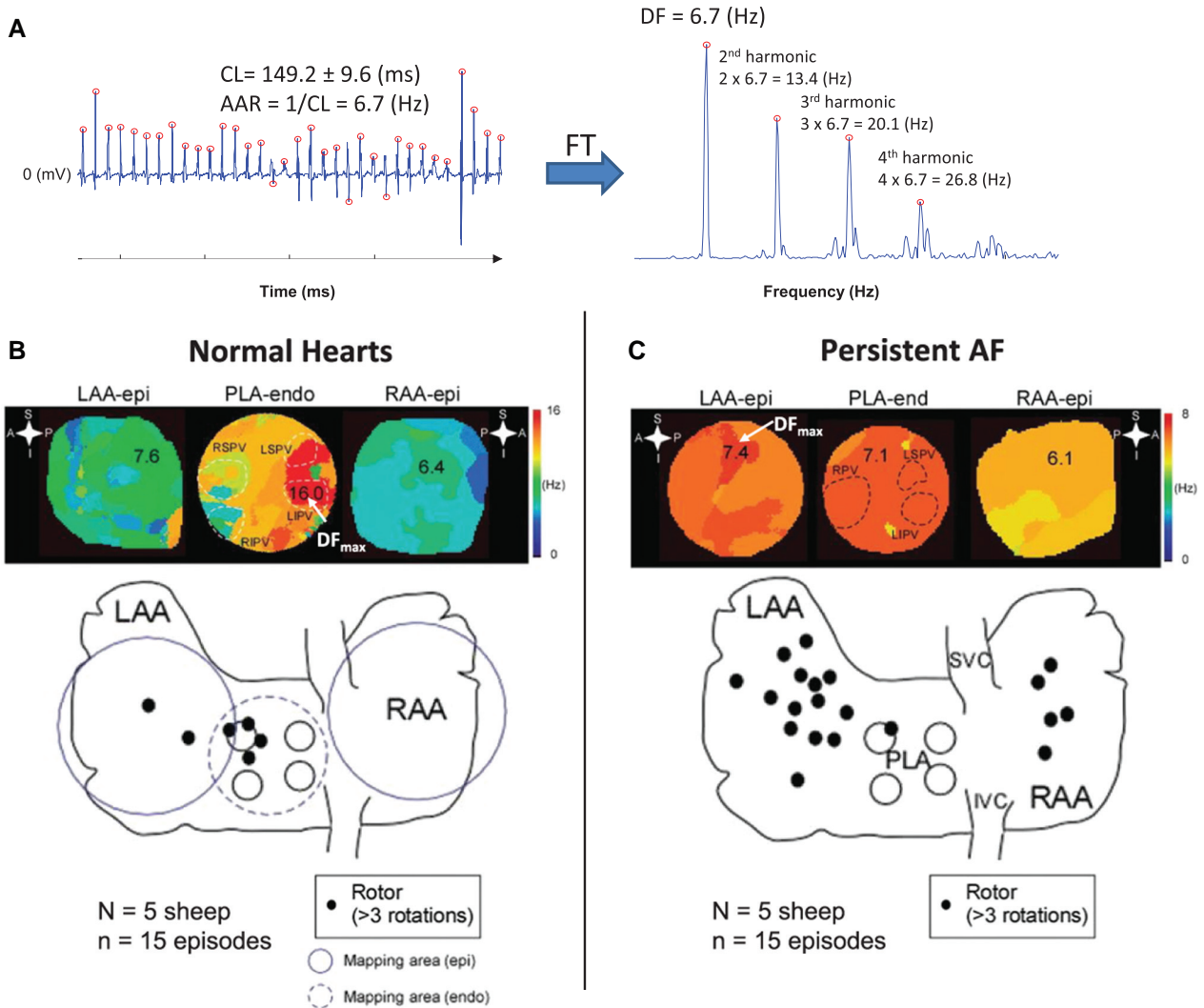
Phase mapping is a complementary approach that enables visualization of the spatiotemporally distributed patterns of propagation during cardiac fibrillation by determining the local phase of the activation/recovery cycle at each time point. It makes it possible to detect the phase singularities (ie, the rotor pivots) that organize reentry and fibrillation (Figure 3). It can also be used to analyze electrograms,<sup>34</sup> although optical mapping (the gold standard) provides much higher resolution and accuracy in space and time when tracking rotor formation and maintenance.<sup>35</sup> A tutorial on phase mapping during cardiac fibrillation can be found elsewhere.<sup>34</sup>

### ***Simultaneous Epicardial and Endocardial Optical Mapping***

The introduction of optical mapping more than 2 decades ago enabled the characterization of wave propagation with submillimeter resolution and postulated rotors as potential drivers of cardiac fibrillation in animal models.<sup>23,26,29,32,36–38</sup> More recently, recording voltage-sensitive dye fluorescence simultaneously from the endocardial and epicardial surfaces (Figure 4A)<sup>24,25,27,28</sup> enabled interpretation of the 3D behavior



**Figure 1. A**, Wavefront (solid line) and wavetail (dashed line) near a rotor core. Wavefront velocity (arrows) decreases with proximity to the core. The wave is blocked at the tip of the rotor as a result of the high curvature of the wavefront, which creates a great imbalance between the depolarizing charge of the wave and the surrounding unexcited tissue (sink-to-source mismatch). Thus, the wave pivots around a singularity point in the excitable but unexcited core of the rotor. Wavelength is defined as the distance between the depolarizing front and the repolarizing tail. **B**, Schematic representation of a 3-dimensional (3D) scroll wave. Its epicardial and endocardial manifestation would be a 2D rotor as the one depicted in **A**. **C**, Spatial distribution of drivers (asterisks: focal breakthroughs, curved arrows: reentry events) reported as the percentage of patients who presented such drivers in persistent atrial fibrillation. **A** and **B**, Reproduced from Pandit and Jalife.<sup>31</sup> **C**, Reproduced from Haissaguerre et al.<sup>6</sup>

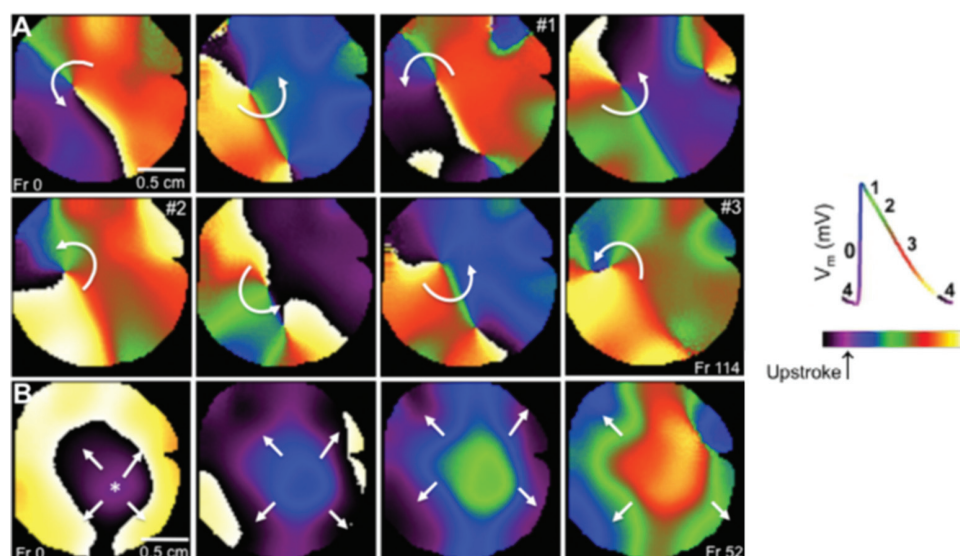


**Figure 2.** **A**, Bipolar electrogram obtained from the left atrial appendage of a patient with atrial fibrillation (AF). Red circles display activation times. Note that the fundamental peak of the spectrum is located at a frequency (DF) that matches the average activation rate (AAR). The peaks located at the frequencies multiple of the DF are called harmonics. A harmonic peak should not be selected as DF because this would lead to wrong conclusions. **B**, **Top**, DF maps in a normal sheep heart during stretch-induced AF showing fibrillatory conduction from the highest frequency domain (DF<sub>max</sub>, 16 Hz, in red) located at the PLA, specifically at the left superior pulmonary vein (LSPV) and left inferior pulmonary vein (LIPV). Colors in each map indicate atrial areas (domains) with different DFs. The color bar on the right indicates frequency in Hz. A large frequency gradient between the fastest (red) and the slowest (blue) domains is usually found in acute episodes of AF. **Bottom**, Aggregated data from normal sheep hearts during stretch-induced AF showed that rotors were mainly located at the PLA and left atrial appendage (LAA). **C**, **Top**, DF maps of atria from sheep with persistent AF showed that a more homogeneous distribution of DFs (lower gradient) was found. The DF<sub>max</sub> domain was located at the LAA (in red, 7.4 Hz). Colors in each map indicate atrial areas (domains) with different DFs. The color bar on the right indicates frequency in Hz. As shown, in persistent AF, the frequency gradient between the fastest and the slowest domains is usually smaller than in paroxysmal episodes. **Bottom**, Aggregated data from hearts showed that, in persistent AF, the role of the pulmonary veins becomes less prevalent in terms of harboring rotors. AAR indicates average activation rate; CL, cycle length; DF, dominant frequency; Endo, endocardial view; Epi, epicardial view; FT, Fourier transform; IVC, inferior vena cava; PLA, posterior left atrium; RAA, right atrial appendage; RIPV, right inferior pulmonary vein; RVP, right pulmonary vein; and SVC, superior vena cava. **B** and **C**, Adapted from Yamazaki et al.<sup>28</sup>

of scroll waves. Generation of phase movies identified several patterns of activation, including rotors (Figure 3A) and breakthroughs (Figure 3B). Interestingly, these experiments identified I-shaped scroll waves in the left atrium spanning from epicardium to endocardium.<sup>28</sup> As expected, each mapped surface showed synchronized 2D rotors (Figure 4B). Other recorded patterns also suggested the presence of L- or U-shaped intramural scroll waves by the presence of differing activation patterns at each surface (Figure 4B).<sup>27</sup> Recently, simultaneous subendo-subepicardial optical mapping of ex

vivo diseased human right atria has shown that pinacidil-induced fibrillatory activity was driven by spatially and temporally stable intramural reentry anchored to fibrosis-insulated and twisted atrial bundles. Radiofrequency ablation of these localized microreentrant tracks terminated the fibrillatory activity.<sup>39</sup> However, current optical mapping strategies do not allow panoramic endocardial mapping and require the use of potentially toxic voltage-sensitive dyes that preclude their use for human in vivo studies.



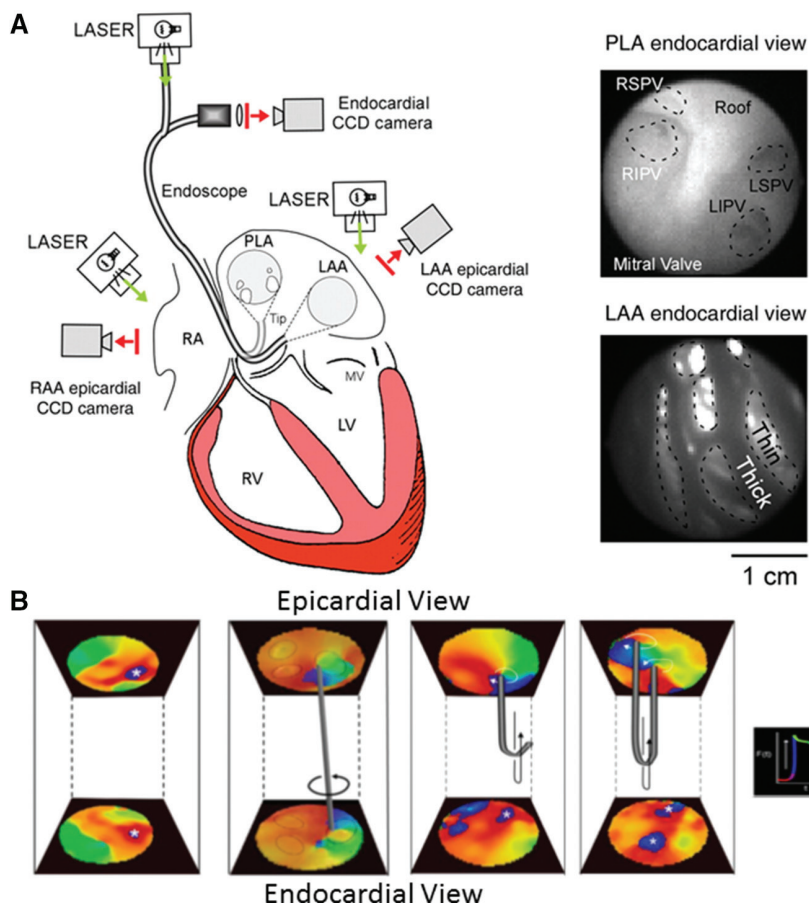


**Figure 3.** Varying activation patterns identified in phase movies from the left atrium of the sheep heart. **A**, Sequential snapshots show a rotor pivoting around a phase singularity (point where all phases converge). **B**, Breakthrough activation pattern. The wave seems on the center of the field of view and propagates outward. **Right**, Key for the different phases of the action potential is color-coded. Reproduced from Filgueiras-Rama et al.<sup>24</sup>

#### Multielectrode Plaque Epicardial Electric Mapping

Over the years, many studies have used high-density multielectrode plaques to record local epicardial electric activity from patients undergoing cardiac surgery.<sup>14,15,21,40</sup> These approaches have the advantage of not requiring the use of

voltage-sensitive dyes, which makes the technique suitable for in vivo mapping in humans. However, placing multielectrode plaques on the epicardium requires open chest surgery and is limited to small areas with limited spatial resolution when compared with optical mapping, although



**Figure 4.** **A**, Optical mapping setup for simultaneous endo-epicardial mapping. An endoscope is focused on the endocardial surface of the posterior left atrium (PLA) or left atrial appendage (LAA). A CCD camera is coupled to the endoscope and laser illumination is provided. Epicardial mapping of PLA or LAA is simultaneously performed. **B**, From left to right: examples of simultaneous endo-epicardial breakthrough activation and potential intramural I-, L-, and U-shaped scroll waves. LIPV indicates left inferior pulmonary vein; LSPV, left superior pulmonary vein; LV, left ventricle; MV, mitral valve; RA, right atrium; RAA, right atrial appendage; RSPV, right superior pulmonary vein; RIPV, right inferior pulmonary vein; and RV, right ventricle. **A**, Reproduced from Yamazaki et al.<sup>28</sup> **B**, Adapted from Yamazaki et al.<sup>27</sup>

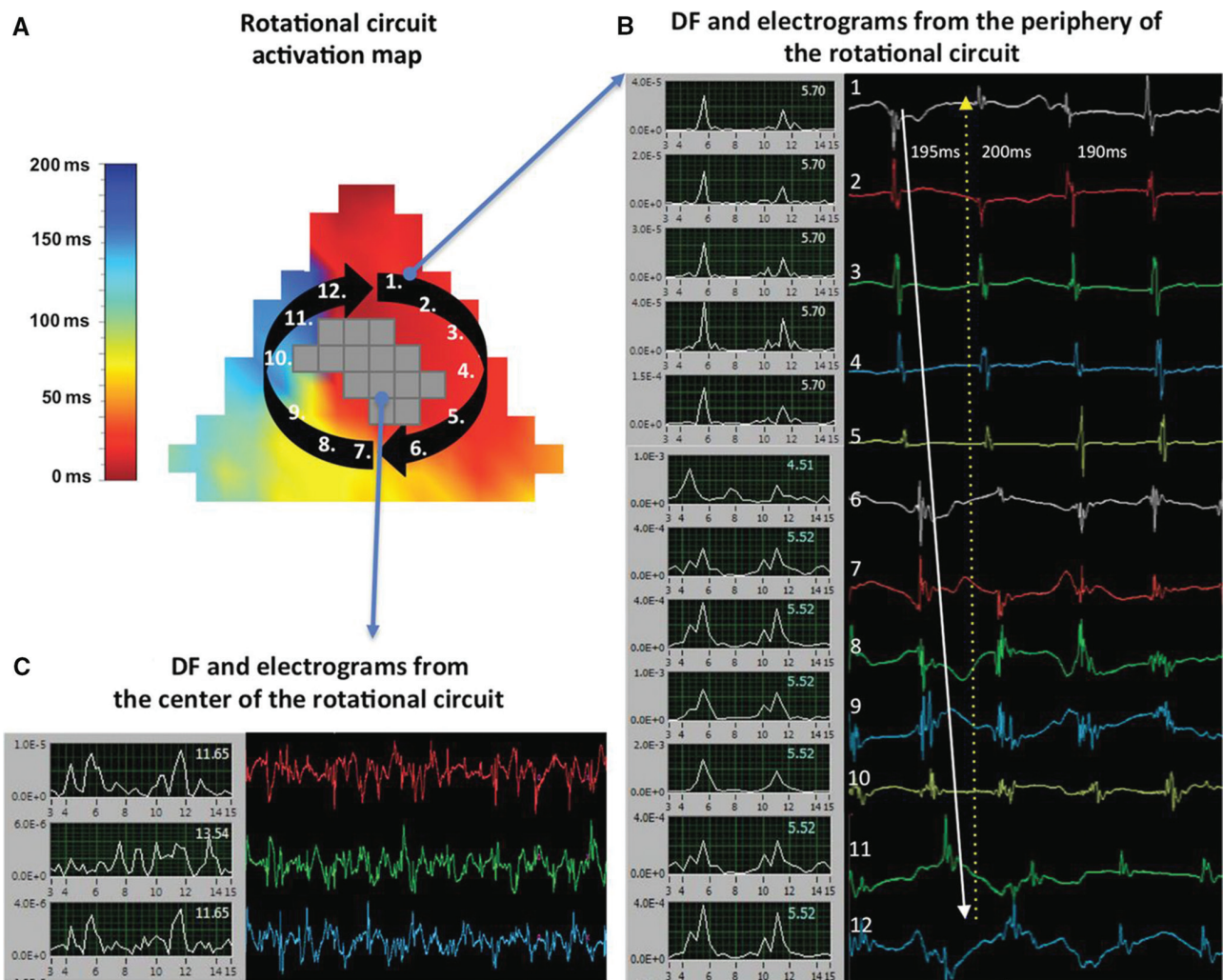
occasionally it is possible to identify rotational activation sequences, which might be compatible with rotors (Figure 5).<sup>40</sup>

#### **Basket-Catheter Endocardial Electric Mapping**

Recently, Narayan et al<sup>7</sup> used two 64-pole basket-catheters to obtain simultaneous unipolar endocardial electrograms from 128 locations in both atria of patients undergoing AF ablation (Figure 6A). A computational mapping system (Rhythm-View, Topera, Inc) processed these electrograms to generate activation movies of the atrial electric activity after considerable processing and interpolation.<sup>41</sup> Local activation times were calculated as the times when each unipolar electrogram crosses a certain voltage threshold. Monophasic action potentials were used to establish the minimum repolarization interval and obtain physiologically feasible sequential activation paths. Movies of activation patterns and isochronal maps from individual cycles were obtained after using bilinear interpolation of the “phase state” between each electrode

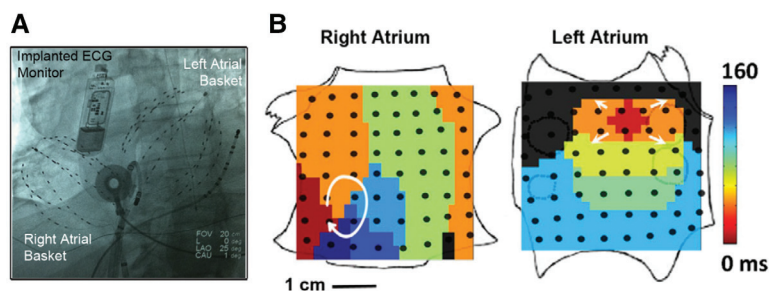
and its nearest neighbors (Figure 6B).<sup>41</sup> Rotational activities (early-meets-late, ie, red-meets-blue) around a center of rotation were identified as rotors. Focal (centrifugal) activations were also identified. Both were considered drivers only if they sustained for  $\geq 50$  rotations or focal discharges (arbitrary limit).<sup>7</sup> The main advantages of this approach are that, in contrast to the ECGI method described below, (1) it does not use estimated but real cardiac potentials and (2) enables real-time assessment of changes in driver activity during the ablation procedure. More arguments in favor of this mapping approach can be found elsewhere in a recent theoretical study.<sup>41</sup>

However, there are many limitations that need to be considered: (1) the system uses a proprietary algorithm that makes the methodology difficult to evaluate because the electrograms from which the color maps are obtained are not usually shown; (2) like any other electrode recording system, extracellular signals are subject to artifacts,<sup>35</sup> and ventricular



**Figure 5.** A, Activation map of a clockwise revolution of a rotational circuit at the posterior left atrial wall. Electrodes registering complex fractionated atrial electrograms (CFAEs) at the core are shown in gray (no local activation times were assigned given their ambiguity). B, Frequency domain (left, 3–15 Hz) and time domain (right) electrograms from sites just outside the core (1–12). The numbers in the frequency domain signals display dominant frequencies. The white arrow in the time domain displays the clockwise sequence of activation. C, Frequency domain (left, 3–15 Hz) and time domain (right) CFAEs from sites inside the core. DF indicates dominant frequency. Reproduced from Lee et al<sup>40</sup> with permission of the publisher. Copyright © 2013, The Authors.





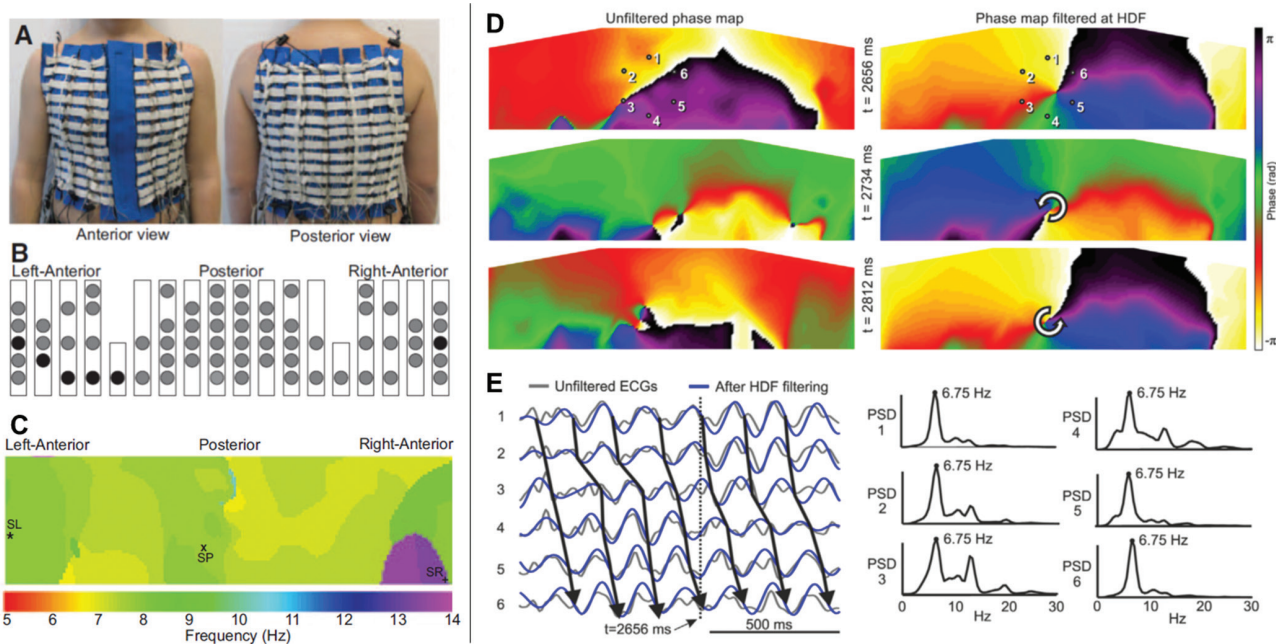
**Figure 6.** **A**, Two 64-pole basket-catheters deployed in both atria. **B**, Maps showing a stable clockwise right atrial rotor and a simultaneous left atrial breakthrough in a patient with persistent atrial fibrillation (AF). One year after ablating these 2 drivers the patient remained AF free. Reproduced from Narayan et al<sup>7</sup> with permission of the publisher. Copyright © 2012, the American College of Cardiology Foundation.

activity often contaminates atrial recordings; thus an appropriate QRS-T complex subtraction technique is critical; (3) basket-catheters often offer suboptimal electrode-tissue contact at many poles; (4) the splines are sometimes not equidistantly separated once they are deployed in the atria and the raw interspline spatial resolution offered by basket-catheters is poor; (5) in the presence of scarce or poor quality data, the amount of extrapolation is difficult to determine; and (6) interpolation of phases is inherently biased toward detection of rotors as the algorithm is devised to demonstrate rotational activity. Thus, focal activation might be displayed as rotational activity if the wavefront reaches the surrounding electrodes sequentially.<sup>35</sup> Although the approach is not universally accepted, it is one of the first mechanistically based approaches to AF ablation that has reported promising results in the long-term<sup>42</sup> and during its first multicenter validation.<sup>22</sup>

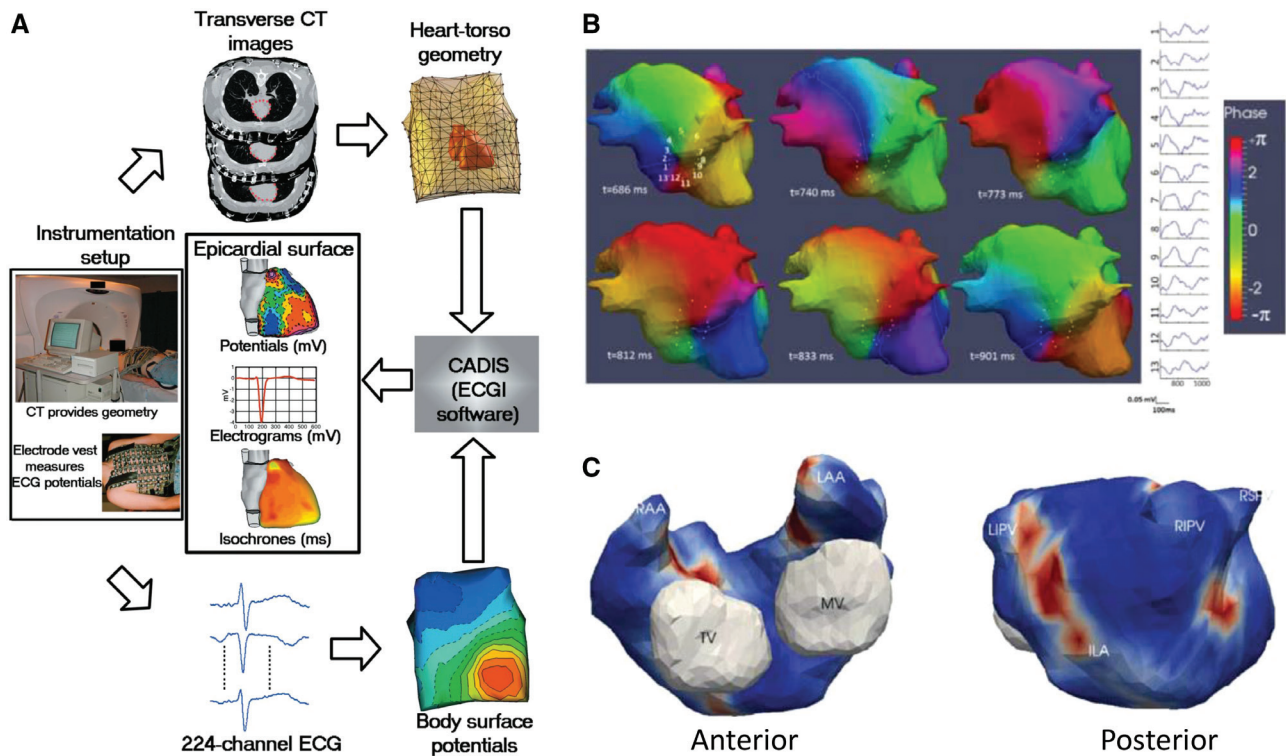
### Body Surface Mapping

The noninvasive body surface mapping (BSM) methodology has recently gained visibility for the analysis of activation

patterns during AF.<sup>43,44</sup> Guillem et al<sup>43</sup> used a custom-made 67-electrode vest that covered the whole torso of the patient (Figure 7A and 7B); intracardiac signals at several locations were simultaneously recorded. They selected either segments without ventricular activity after adenosine infusion or applied QRS-T subtraction if such intervals were not found. After computing and performing comparisons between intracardiac and surface DF maps, they demonstrated that high-frequency sources could be reflected on a small area of the body surface close to the atrium harboring the highest DF (Figure 7C).<sup>43</sup> More recently, Rodrigo et al<sup>44</sup> used phase mapping and filtered the unipolar signals with a narrow 2-Hz band-pass around the highest DF filtering to improve the detection of stable rotors (8.3% of the time before filtering and 73% after filtering, Figure 7D and 7E). Before highest DF band-pass filtering, phase maps displayed unstable reentries, probably as a result of superposition of the disorganized electric activity coming from the rest of atrial tissue. Highest DF band-pass filtering accentuated the organized activity of scroll waves, after which



**Figure 7.** **A**, Custom-made vest with 67 electrodes. **B**, Location of surface electrodes (circles). **C**, Dominant frequency (DF) map of the torso during atrial fibrillation (AF) with the right atrium faster than the left atrium. SL indicates surface left; SP, surface posterior; and SR, surface right. **D**, Phase movie snapshots before and after highest DF (HDF) band-pass filtering to improve detection of stable reentries during AF. **E**, **Left**, Unipolar electrograms in the 6 points around the core of rotation in **D** before (black) and after (blue) HDF filtering. **Right**, Their power spectrum before HDF filtering showing the rotor activity at 6.75 Hz and residual disorganized activity coming from the rest of the atria. PSD indicates power spectral density. **A–C**, Reproduced from Guillem et al.<sup>43</sup> **D** and **E**, Reproduced from Rodrigo et al.<sup>44</sup>



**Figure 8.** **A**, Block diagram of the electrocardiographic imaging (ECGI) procedure. **B**, Phase mapping of ECGI data in a patient with persistent AF. A full rotation of a rotor in the inferior left atrium is displayed. Electrograms around its core are also shown (1–12). **C**, Example of a driver density map used to guide the ablation process in a patient with drivers clustered in 3 regions: inferoposterior left atrium (ILA) and right and left pulmonary veins. CT indicates computed tomography; LAA, left atrial appendage; LIPV, left inferior pulmonary vein; MV, mitral valve; RAA, right atrial appendage; RIPV, right inferior pulmonary vein; RSPV, right superior pulmonary vein; and TV, tricuspid valve. **A**, Reprinted from Ramanathan et al<sup>45</sup> with permission of the publisher. Copyright © 2004, Nature Publishing Group. **B** and **C**, Reproduced from Haissaguerre et al.<sup>6</sup>

rotors were the main pattern of activation during AF (median of 2.8 rotations, present 73% of the time). Also, computer simulations showed that epicardial propagation is spatially smoothed when projected on the torso. For example, nearby epicardial rotors with opposing chirality may not be detected on the torso. This fact and the possibility of temporal intervals in which AF activity may be affected by ectopic foci, could explain the lack of detected rotors during the remaining 27% of the time.<sup>44</sup>

### Electrocardiographic Imaging

The output of BSM is potentials on the body surface, not on the heart. In contrast, the ECGI mapping system developed by the Rudy laboratory (Figure 8A) provides estimated epicardial electrograms in relation to the heart's anatomy. The approach uses >250 electrodes distributed throughout the patient's torso, which in combination with computed tomographic imaging enables the positioning of the heart's epicardial geometry in relation with the electrode positions. The body surface potentials recorded by the electrodes and the geometric information provided by computed tomography are combined by complex mathematical algorithms that solve the electrocardiographic inverse problem to noninvasively obtain estimated epicardial electrograms.<sup>45,46</sup>

The main advantage of this approach is that it is noninvasive and it does not require surgery or sedation, and could be used to provide detailed data on follow-ups and AF recurrence.<sup>45,46</sup>

However, limitations similar to the BSM approach apply because AF body surface potentials often have low voltages and are smoothed by the torso volume conductor.<sup>44,46</sup> These include poor sensitivity for detecting low amplitude signals (eg, from scarred or previously ablated areas) or highly localized sources.<sup>44,46</sup> Indeed, ECGI does not discern among epicardial breakthroughs, spontaneous depolarizations and microreentry (subcentimeter), which are seen as focal activity.<sup>46</sup> Also, ECGI is limited to providing virtual electrograms of the atrial epicardium. Therefore, activity on the interatrial septum, pulmonary vein-left atrial appendage ridge, etc, is not recorded. Importantly, computed tomographic imaging is required to obtain the torso geometry, so the patient is exposed to a considerable dose of radiation.<sup>45,46</sup>

Haissaguerre et al<sup>6</sup> have recently used the ECGI approach,<sup>45,46</sup> combined with phase mapping to detect AF drivers during persistent AF and guide the ablation procedure. Intervals ( $\geq 1$  s) free from ventricular activity were selected for analysis to avoid QRS-T complex subtraction.<sup>6</sup> Phase mapping movies were displayed over the biatrial geometry. AF sources were classified as either focal or reentry. In the latter, raw local electrograms were visualized to confirm their truly reentrant nature (sequential activation around the core, Figure 8B). The authors reported that these rotors moved over wide regions of the atria, but recurred periodically in the same region. The median and maximum number of rotations per rotor was 2.6 and 8, respectively.



## Outcomes of New Mapping and Mechanistic Approaches for AF Ablation

Pulmonary vein isolation (PVI) remains the “gold standard” approach to treat drug-refractory AF. However, its success rate remains suboptimal especially in patients with persistent AF in whom more extensive ablation techniques have been proposed.<sup>3</sup> Targeting CFAEs or linear ablation are some of the complementary strategies after PVI.<sup>3</sup> Recent results from the Substrate and Trigger Ablation for Reduction of Atrial Fibrillation Trial Part II (STAR AF II) trial have shown that the addition of further ablation (lines or CFAEs) to PVI increased ablation time but did not reduce the recurrence of AF in 589 patients with persistent AF.<sup>3</sup> At 18 months, the percentage of patients who were free from AF recurrence after 1 procedure without antiarrhythmic medication did not significantly differ among groups (PVI alone, 48%; PVI+CFAEs, 37%; and PVI+lines, 33%).<sup>3</sup> This confirms that CFAE and extensive ablation has clearly lost momentum in favor of more specific and mechanistically based approaches for AF ablation.

### Ablation of High DF Sites

Because atrial regions with the highest activation frequencies ( $DF_{max}$ ) may host the drivers that maintain AF,<sup>4,5,23</sup> targeting  $DF_{max}$  areas may effectively terminate AF. Atenza et al<sup>4</sup> first used such a strategy in patients with AF.<sup>4</sup> They used an electro-anatomical mapping system with embedded real-time spectral analysis capabilities to generate DF maps during sequential acquisition of bipolar signals.<sup>4</sup> PVI was complemented with ablation of  $DF_{max}$  sites. This protocol achieved 88% and 56% long-term freedom of AF in patients with paroxysmal and persistent AF, respectively, in all cases a DF gradient was abolished by the ablation.<sup>4</sup> Even though sequential point-by-point acquisition of bipolar signals is limited in its ability to identify high-frequency sources that are often dynamic, and may drift or change over time, the recent multicenter Radiofrequency Ablation of Drivers of Atrial Fibrillation (RADAR-AF) trial conducted in 232 patients demonstrated that targeting  $DF_{max}$  sites in paroxysmal AF was not inferior to, and was associated with a lower incidence of severe adverse events than conventional PVI at 1-year follow-up.<sup>5</sup> Although a pure  $DF_{max}$  mapping strategy has not been compared with PVI in persistent AF cases,  $DF_{max}$  ablation after PVI did not improve ablation outcomes and significantly increased the risk of adverse events.<sup>5</sup> These results have been interpreted by some as “more evidence favoring antral PVI in patients with either paroxysmal or persistent AF”.<sup>47</sup> However, an alternative interpretation is that (1) PVI is not the “cure” for all AF, (2) extensive ablation procedures that include PVI predict a poor long-term outcome,<sup>3</sup> and (3) there is an urgent need for more mechanistically based mapping to guide limited ablation strategies.

### FIRM Ablation

The novel computational mapping approach described in a previous section (Basket-Catheter Endocardial Electrical Mapping) has recently shown localized sources (long-standing rotors or foci) sustaining the arrhythmia in 98% of patients with AF.<sup>7</sup> The patients (71% with persistent AF) were prospectively treated by focal impulse and rotor modulation (FIRM)-guided ablation followed by PVI versus PVI alone. In each case, a median of 2 sources were classified as reentrant. The number

of sources was significantly higher in patients with persistent AF than in patients with paroxysmal AF. Interestingly, AF acutely terminated in 56% of cases after brief ablation of the primary source without performing PVI. Conversely, AF termination was only achieved in 20% of cases who underwent conventional PVI. Recently, an extended 3-year follow-up results of the trial have been reported.<sup>42</sup> Patients in the FIRM-guided ablation group maintained higher rates of freedom from AF (78% versus 36%) after a single procedure. However, it is important to note that FIRM-guided ablation protocol included not just the ablation of potential drivers, but also, PVI and other standard procedures.<sup>42</sup> The initial independent outcomes for FIRM ablation at 10 experienced centers have been also reported.<sup>22</sup> Each patient exhibited a similar mean of rotors/focal sources ( $\approx 2.3$ ) as previously reported (25% in the right atrium). After a single procedure and 1-year follow-up freedom from AF was 87.5%.<sup>22</sup>

### Ablation of Driver Domains in Persistent AF

Recently, Haissaguerre et al<sup>6</sup> reported the results of their mechanistic approach in persistent AF ablation. They used ECGI combined with phase mapping to identify the drivers of persistent AF in 103 patients undergoing AF ablation. They observed incessantly changing wavefronts and a varying spatiotemporal behavior of drivers.<sup>6</sup> Reentrant drivers were unsustainable and meandered substantially, but recurred repetitively in the same region. Aggregated driver density maps (Figure 8C) were computed during a cumulative registering period to guide the ablation procedure (median, 4 driver domains per patient). Interestingly, the number of driver regions increased with the continuous duration of AF. Ablation of driver domains alone terminated AF in 63% of patients presenting in AF (75% persistent and 15% long-lasting persistent AF), which supports the presence of stable high-frequency sources at certain regions of the atria. The onset or extinction of drivers during ablation was not assessed, so there is room for improving the ablation results if real-time data are used.<sup>6</sup> After a 12-month follow-up, 83% and 75% of patients with paroxysmal or persistent/long-lasting AF were free from AF, respectively.<sup>6</sup>

### Controversies and Future Directions

Multiple experimental and clinical studies using widely different technologies are creating a growing body of evidence in favor of organized sources underlying AF maintenance. It remains unresolved whether such sources are (1) one or a few stationary and stable rotors or microanatomic intramural re-entries, (2) multiple short lived but iteratively created rotors at restricted locations, (3) stable ectopic foci, or (4) short lived but repetitively triggered focal bursts. Interestingly, some of these seemingly different underlying mechanisms might converge if one considers the different mapping, filtering, and interpolation approaches that are being used to display the atrial electric data, the 3D nature of the atrial tissue, and the imperfections of the recording systems being used. For example, although apparently different, rotors/intramural reentry and foci may be dynamic manifestations of the same mechanism within the 3D structure of the atria. Thus, so-called foci might actually represent breakthroughs generated

by intramural scroll waves with nonlinear filament shapes (U shape, L shape, or even O shape, Figure 4B),<sup>27,28,30</sup> or micro-anatomic intramural reentries.<sup>39</sup>

The noninvasive ECGI approach by Cuculich et al<sup>46</sup> showed foci, but only rarely demonstrated reentry in AF. Rotors seemed short lived but their location was reproducible through several ECGI movies.<sup>46</sup> However, ECGI lacks the ability to discern among epicardial breakthroughs, spontaneous depolarizations, and (subcentimeter) microreentry, which are seen as focal activity.<sup>46</sup> In addition, in BSM (and likely in ECGI), appropriate filtering enables detection of more stable reentrant high-frequency sources by suppressing secondary influences from disorganized activity.<sup>44</sup> Although not fully disclosed, the ECGI/phase mapping approach used by Haissaguerre et al<sup>6</sup> might have included similar filtering because similar stabilities of rotors were reported in both studies (median, 2.8 rotations in Rodrigo et al<sup>44</sup> and 2.6 rotations in Haissaguerre et al<sup>6</sup>). In both studies, rotors were detected most of the time.<sup>6,44</sup> The presence of fast reentrant sources and the concept that targeting limited areas may be enough to terminate AF is supported by the outcomes of recent studies.<sup>4-7,39,42</sup> In contrast, it is now clear that targeting CFAEs or performing additional linear ablation add unnecessary ablation because of lack of specificity.<sup>3</sup>

Even though low-density basket-catheter endocardial electric mapping<sup>7</sup> and noninvasive BSM/ECGI approaches<sup>6,44</sup> provide seemingly different descriptions of the drivers maintaining human AF, both coincide in their mostly reentrant nature. The former describe long-standing drivers.<sup>7</sup> The latter observe substantial drifting and repetitive short-lived reentries requiring statistical driver density maps.<sup>6</sup> Although the interaction of stable high-frequency sources (eg, intramural scroll waves) can produce the onset of repetitive drifting rotors,<sup>37</sup> these differences most likely rely on the filtering methods in BSM/ECGI approaches and the extent of interpolation used in basket-catheter mapping. Thus, excessive interpolation/filtering or lack thereof may lead to differing conclusions about the actual stability of the sources driving AF.

From the foregoing, it can be surmised that rotors are an important mechanism for sustaining AF in humans, although other mechanisms might certainly be involved in initiation and specific cases of AF maintenance.<sup>48</sup> Nowadays, experimental data and ablation outcomes are making it increasingly apparent that sequential acquisition of epicardial electric data over small areas of the atria during cardiac surgery<sup>21</sup> may be insufficient as it might simply show epiphenomena, reflecting disorganized activity (fibrillatory conduction).

There is still substantial room for improvement in detecting AF drivers. New technological breakthroughs to obtain experimental and clinical panoramic data will certainly help in tracking drifting rotor trajectories over wide areas of the atria. In the clinic, a panoramic, direct-contact endocardial mapping system with higher density of electrodes than currently available would offer enhanced spatial resolution and help increase accuracy. This would provide more and better signals to compute, minimizing interpolation in the maps used to guide the ablation procedure. In this regard, new basket-catheters with more electrodes might be useful. In both experimental and clinical scenarios, robust algorithms

to track drifting, meandering or stationary rotors during long periods of time would be of interest.<sup>37</sup> We recently showed that beat phenomena and amplitude modulation patterns in cardiac potentials can be useful to track rotors.<sup>37</sup> Potentially, this strategy might be used during AF even with a single mapping catheter. In addition, a combined activation, phase, and frequency mapping approach might prove extremely useful. Areas allegedly hosting rotors or foci in endocardial basket-catheter or BSM/ECGI maps detected by any of these mapping approaches could be locally remapped with much higher spatial resolution using a novel 64-pole mini-basket catheter (IntellaMap Orion; Boston Scientific) to confirm or exclude the existence of a potential driver.

## Concluding Remarks

Recent studies using differing novel mapping approaches specifically targeting potential AF sources have been reported with promising results. Such mechanistically based ablation techniques evolved thanks to insights into the dynamic patterns of AF provided by optical mapping studies and computer-based simulations of AF dynamics,<sup>23-29,32,36,38</sup> which yielded algorithms that are now being used in point-by-point sequential mapping,<sup>4,5</sup> basket-catheter mapping,<sup>7,22</sup> BSM,<sup>43,44</sup> and ECGI.<sup>6</sup> Interestingly, all data generated to date are compatible with the concept that a small number of localized high-frequency sources can maintain AF for relatively long periods of time. It is our expectation that, in the near future, (1) simultaneous panoramic endocardial and epicardial optical mapping in the experimental laboratory, (2) higher density electric mapping combined with activation, frequency, and phase mapping in the clinical laboratory, and (3) new algorithms to accurately detect and track rotors and foci in both scenarios will provide a more complete understanding of AF driver dynamics. Hopefully, the increase in knowledge will improve the acute and long-term success rates of AF ablation to the benefit of the patient.

## Sources of Funding

This study was supported by grants from Fondo Europeo de Desarrollo Regional and Instituto de Salud Carlos III (RD12/0042/0036 [RIC], RD06/0003/0009 [REDINSCOR]). The Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the Pro-CNIC Foundation. Supported also by the Salud 2000 Foundation (Dr Filgueiras-Rama); the Leducq Foundation (Drs Jalife and Berenfeld), the University of Michigan Health System and Peking University Health Sciences Center Joint Institute for Translational and Clinical Research; grants R01-HL122352 (Dr Jalife) and R01-HL118304 (Dr Berenfeld) from the US National Institutes of Health.

## Disclosures

Dr Jalife serves on the Scientific Advisory Board of Topera, Inc. Dr Berenfeld is a cofounder and scientific officer of Rhythm Solutions, Inc.

## References

- Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*. 1998;339:659–666. doi: 10.1056/NEJM199809033391003.

2. Dewire J, Calkins H. Update on atrial fibrillation catheter ablation technologies and techniques. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10:599–612. doi: 10.1038/nrcardio.2013.121.
3. Verma A, Jiang CY, Betts TR, Chen J, Deisenhofer I, Mantovan R, Macle L, Morillo CA, Haverkamp W, Weerasooriya R, Albenque JP, Nardi S, Menardi E, Novak P, Sanders P; STAR AF II Investigators. Approaches to catheter ablation for persistent atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2015;372:1812–1822. doi: 10.1056/NEJMoa1408288.
4. Atienza F, Almendral J, Jalife J, Zlochiver S, Ploutz-Snyder R, Torrecilla EG, Arenal A, Kalifa J, Fernández-Avilés F, Berenfeld O. Real-time dominant frequency mapping and ablation of dominant frequency sites in atrial fibrillation with left-to-right frequency gradients predicts long-term maintenance of sinus rhythm. *Heart Rhythm*. 2009;6:33–40. doi: 10.1016/j.hrthm.2008.10.024.
5. Atienza F, Almendral J, Ormaetxe JM, Moya A, Martínez-Alday JD, Hernández-Madrid A, Castellanos E, Arribas F, Arias MÁ, Tercedor L, Peinado R, Arcocha MF, Ortiz M, Martínez-Alzamora N, Arenal A, Fernández-Avilés F, Jalife J; RADAR-AF Investigators. Comparison of radiofrequency catheter ablation of drivers and circumferential pulmonary vein isolation in atrial fibrillation: a noninferiority randomized multicenter RADAR-AF trial. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:2455–2467. doi: 10.1016/j.jacc.2014.09.053.
6. Haissaguerre M, Hocini M, Denis A, Shah AJ, Komatsu Y, Yamashita S, Daly M, Amraoui S, Zellerhoff S, Picat MQ, Quotb A, Jesel L, Lim H, Ploux S, Bordachar P, Attuel G, Meillet V, Ritter P, Derval N, Sacher F, Bernus O, Cochet H, Jais P, Dubois R. Driver domains in persistent atrial fibrillation. *Circulation*. 2014;130:530–538. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005421.
7. Narayan SM, Krummen DE, Shivkumar K, Clopton P, Rappel WJ, Miller JM. Treatment of atrial fibrillation by the ablation of localized sources: CONFIRM (Conventional Ablation for Atrial Fibrillation With or Without Focal Impulse and Rotor Modulation) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:628–636. doi: 10.1016/j.jacc.2012.05.022.
8. Jalife J. Déjà vu in the theories of atrial fibrillation dynamics. *Cardiovasc Res*. 2011;89:766–775. doi: 10.1093/cvr/cvq364.
9. Lewis T, Fell H, Stroud W. Observations upon flutter and fibrillation. *Heart*. 1920;7:191–233.
10. Scherf D. Studies on auricular tachycardia caused by aconitine administration. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1947;64:233–239.
11. Moe GK, Abildskov JA. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *Am Heart J*. 1959;58:59–70.
12. Cox JL. The surgical treatment of atrial fibrillation. IV. Surgical technique. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1991;101:584–592.
13. Allesie MA, Bonke FL, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The “leading circle” concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ Res*. 1977;41:9–18.
14. Konings KT, Kirchhof CJ, Smeets JR, Wellens HJ, Penn OC, Allesie MA. High-density mapping of electrically induced atrial fibrillation in humans. *Circulation*. 1994;89:1665–1680.
15. Nitta T, Ishii Y, Miyagi Y, Ohmori H, Sakamoto S, Tanaka S. Concurrent multiple left atrial focal activations with fibrillatory conduction and right atrial focal or reentrant activation as the mechanism in atrial fibrillation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127:770–778. doi: 10.1016/j.jtcvs.2003.05.001.
16. Nademanee K, McKenzie J, Kosar E, Schwab M, Sunsaneewitayakul B, Vasavakul T, Khunnawat C, Ngarmukos T. A new approach for catheter ablation of atrial fibrillation: mapping of the electrophysiologic substrate. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:2044–2053. doi: 10.1016/j.jacc.2003.12.054.
17. Zlochiver S, Yamazaki M, Kalifa J, Berenfeld O. Rotor meandering contributes to irregularity in electrograms during atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2008;5:846–854. doi: 10.1016/j.hrthm.2008.03.010.
18. Atienza F, Calvo D, Almendral J, Zlochiver S, Grzeda KR, Martínez-Alzamora N, González-Torrecilla E, Arenal A, Fernández-Avilés F, Berenfeld O. Mechanisms of fractionated electrograms formation in the posterior left atrium during paroxysmal atrial fibrillation in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:1081–1092. doi: 10.1016/j.jacc.2010.09.066.
19. Ashihara T, Haraguchi R, Nakazawa K, Namba T, Ikeda T, Nakazawa Y, Ozawa T, Ito M, Horie M, Trayanova NA. The role of fibroblasts in complex fractionated electrograms during persistent/permanent atrial fibrillation: implications for electrogram-based catheter ablation. *Circ Res*. 2012;110:275–284. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.255026.
20. Correa de Sa DD, Thompson N, Stinnett-Donnelly J, Znojkwicz P, Habel N, Muller JG, Bates JH, Buzas JS, Spector PS. Electrogram fractionation: The relationship between spatiotemporal variation of tissue excitation and electrode spatial resolution. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011;4:909–916.
21. de Groot NM, Houben RP, Smeets JL, Boersma E, Schotten U, Schalij MJ, Crijns H, Allesie MA. Electropathological substrate of longstanding persistent atrial fibrillation in patients with structural heart disease: epicardial breakthrough. *Circulation*. 2010;122:1674–1682. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.910901.
22. Miller JM, Kowal RC, Swarup V, Daubert JP, Daoud EG, Day JD, Ellenbogen KA, Hummel JD, Baykaner T, Krummen DE, Narayan SM, Reddy VY, Shivkumar K, Steinberg JS, Wheelan KR. Initial independent outcomes from focal impulse and rotor modulation ablation for atrial fibrillation: multicenter FIRM registry. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2014;25:921–929. doi: 10.1111/jce.12474.
23. Berenfeld O, Mandapati R, Dixit S, Skanes AC, Chen J, Mansour M, Jalife J. Spatially distributed dominant excitation frequencies reveal hidden organization in atrial fibrillation in the Langendorff-perfused sheep heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000;11:869–879.
24. Filgueiras-Rama D, Martins RP, Mironov S, Yamazaki M, Calvo CJ, Ennis SR, Bandaru K, Noujaim SF, Kalifa J, Berenfeld O, Jalife J. Chloroquine terminates stretch-induced atrial fibrillation more effectively than flecainide in the sheep heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:561–570. doi: 10.1161/CIRCEP.111.966820.
25. Filgueiras-Rama D, Price NF, Martins RP, Yamazaki M, Avula UM, Kaur K, Kalifa J, Ennis SR, Hwang E, Devabhaktuni V, Jalife J, Berenfeld O. Long-term frequency gradients during persistent atrial fibrillation in sheep are associated with stable sources in the left atrium. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:1160–1167. doi: 10.1161/CIRCEP.111.969519.
26. Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O, Jalife J. Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation*. 2000;101:194–199.
27. Yamazaki M, Filgueiras-Rama D, Berenfeld O, Kalifa J. Ectopic and reentrant activation patterns in the posterior left atrium during stretch-related atrial fibrillation. *Prog Biophys Mol Biol*. 2012;110:269–277. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2012.08.004.
28. Yamazaki M, Mironov S, Taravanc C, Brec J, Vaquero LM, Bandaru K, Avula UM, Honjo H, Kodama I, Berenfeld O, Kalifa J. Heterogeneous atrial wall thickness and stretch promote scroll waves anchoring during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2012;94:48–57. doi: 10.1093/cvr/cvr357.
29. Skanes AC, Mandapati R, Berenfeld O, Davidenko JM, Jalife J. Spatiotemporal periodicity during atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation*. 1998;98:1236–1248.
30. Wellner M, Berenfeld O, Jalife J, Pertsov AM. Minimal principle for rotor filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8015–8018. doi: 10.1073/pnas.112026199.
31. Pandit SV, Jalife J. Rotors and the dynamics of cardiac fibrillation. *Circ Res*. 2013;112:849–862. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300158.
32. Gray RA, Pertsov AM, Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation. *Nature*. 1998;392:75–78. doi: 10.1038/32164.
33. Ng J, Goldberger JJ. Understanding and interpreting dominant frequency analysis of AF electrograms. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007;18:680–685. doi: 10.1111/j.1540-8167.2007.00832.x.
34. Umapathy K, Nair K, Masse S, Krishnan S, Rogers J, Nash MP, Nanthakumar K. Phase mapping of cardiac fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2010;3:105–114. doi: 10.1161/CIRCEP.110.853804.
35. Berenfeld O, Oral H. The quest for rotors in atrial fibrillation: different nets catch different fishes. *Heart Rhythm*. 2012;9:1440–1441. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.04.029.
36. Gray RA, Jalife J, Panfilov AV, Baxter WT, Cabo C, Davidenko JM, Pertsov AM. Mechanisms of cardiac fibrillation. *Science*. 1995;270:1222–1223.
37. Quintanilla JG, Moreno J, Archondo T, Chin A, Pérez-Castellano N, Usandizaga E, García-Torrent MJ, Molina-Morúa R, González P, Rodríguez-Bobada C, Macaya C, Pérez-Villacastín J.  $K_{ATP}$  channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2013;99:576–585. doi: 10.1093/cvr/cvt093.
38. Davidenko JM, Pertsov AV, Salomonsz R, Baxter W, Jalife J. Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle. *Nature*. 1992;355:349–351. doi: 10.1038/355349a0.
39. Hansen BJ, Zhao J, Csepe TA, Moore BT, Li N, Jayne LA, Kalyanasundaram A, Lim P, Bratasz A, Powell KA, Simonetti OP, Higgins RS, Kilic A, Mohler PJ, Janssen PM, Weiss R, Hummel JD, Fedorov VV. Atrial fibrillation driven by micro-anatomic intramural re-entry revealed by simultaneous sub-epicardial and sub-endocardial optical mapping in

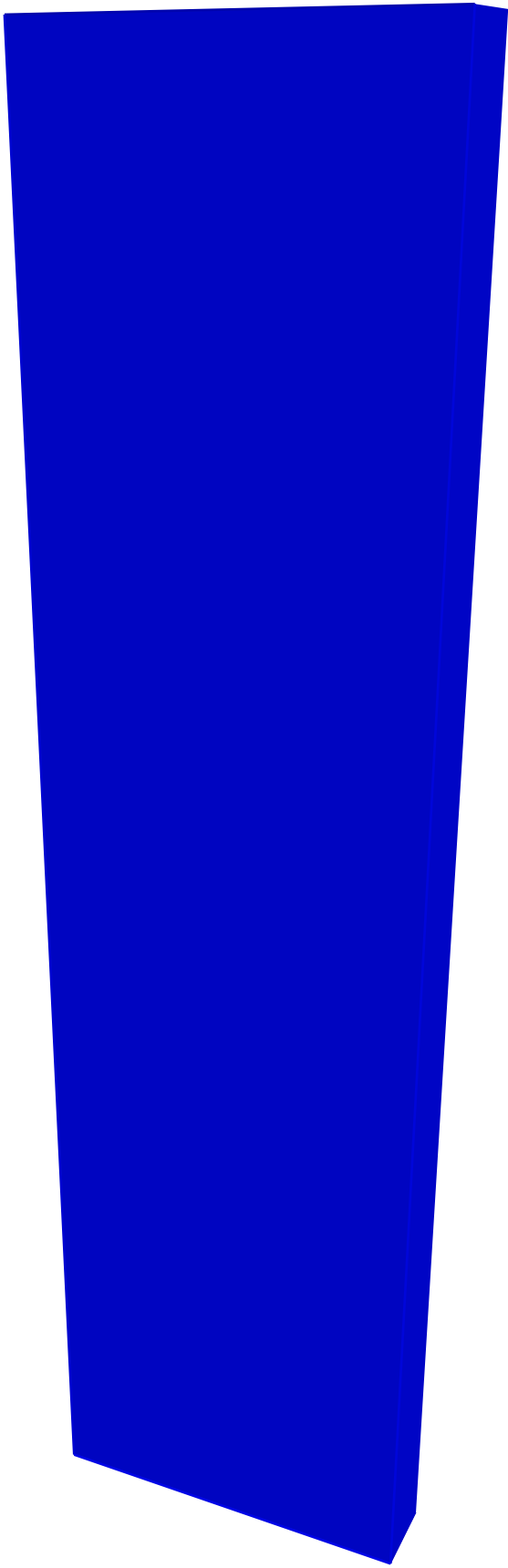
- explanted human hearts. *Eur Heart J*. 2015;36:2390–2401. doi: 10.1093/eurheartj/ehv233.
40. Lee G, Kumar S, Teh A, Madry A, Spence S, Larobina M, Goldblatt J, Brown R, Atkinson V, Moten S, Morton JB, Sanders P, Kistler PM, Kalman JM. Epicardial wave mapping in human long-lasting persistent atrial fibrillation: transient rotational circuits, complex wavefronts, and disorganized activity. *Eur Heart J*. 2014;35:86–97. doi: 10.1093/eurheartj/ehv267.
  41. Rappel WJ, Narayan SM. Theoretical considerations for mapping activation in human cardiac fibrillation. *Chaos*. 2013;23:023113. doi: 10.1063/1.4807098.
  42. Narayan SM, Baykaner T, Clopton P, Schrick A, Lalani GG, Krummen DE, Shivkumar K, Miller JM. Ablation of rotor and focal sources reduces late recurrence of atrial fibrillation compared with trigger ablation alone: extended follow-up of the CONFIRM trial (Conventional Ablation for Atrial Fibrillation With or Without Focal Impulse and Rotor Modulation). *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1761–1768. doi: 10.1016/j.jacc.2014.02.543.
  43. Guillem MS, Climent AM, Millet J, Arenal Á, Fernández-Avilés F, Jalife J, Atienza F, Berenfeld O. Noninvasive localization of maximal frequency sites of atrial fibrillation by body surface potential mapping. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013;6:294–301. doi: 10.1161/CIRCEP.112.000167.
  44. Rodrigo M, Guillem MS, Climent AM, Pedrón-Torrecilla J, Liberos A, Millet J, Fernández-Avilés F, Atienza F, Berenfeld O. Body surface localization of left and right atrial high-frequency rotors in atrial fibrillation patients: a clinical-computational study. *Heart Rhythm*. 2014;11:1584–1591. doi: 10.1016/j.hrthm.2014.05.013.
  45. Ramanathan C, Ghanem RN, Jia P, Ryu K, Rudy Y. Noninvasive electrocardiographic imaging for cardiac electrophysiology and arrhythmia. *Nat Med*. 2004;10:422–428. doi: 10.1038/nm1011.
  46. Cuculich PS, Wang Y, Lindsay BD, Faddis MN, Schuessler RB, Damiano RJ Jr, Li L, Rudy Y. Noninvasive characterization of epicardial activation in humans with diverse atrial fibrillation patterns. *Circulation*. 2010;122:1364–1372. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.945709.
  47. Santangeli P, Marchlinski FE. Pulmonary vein isolation for atrial fibrillation: forever young. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:2468–2470. doi: 10.1016/j.jacc.2014.09.054.
  48. Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res*. 2014;114:1483–1499. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302226.

---

KEY WORDS: ablation techniques ■ atrial fibrillation ■ body surface mapping ■ catheter ■ computer simulation ■ optical mapping, anatomic electrical activity ■ spectrum analysis







## Capítulo 6

# Discusión



La presente sección de discusión no tiene como objetivo replicar en español las discusiones de los artículos que se han presentado en los capítulos anteriores, sino más bien complementarlas. Por ello, en esta sección sólo discutiremos: i) algunas cuestiones relevantes relacionadas con el cartografiado óptico (CO), que es el nexo de unión entre los artículos presentados en esta Tesis (apartado 6.1); ii) algunos aspectos adicionales relevantes sobre los mecanismos de la FV que en su mayoría provienen de artículos publicados con posterioridad a la aceptación del trabajo presentado en el **Capítulo 4** (apartado 6.2) y iii) algunos temas que muy recientemente han causado controversia en relación con los mecanismos subyacentes y el papel de los rotores en la fibrilación y los nuevos sistemas de cartografiado y ablación con bases mecanicistas, especialmente la utilidad del análisis espectral para la detección de los directores de la FA,<sup>88</sup> y el sistema FIRM (*Focal Impulse and Rotor Modulation*) de Narayan et al.<sup>91-97</sup> Aunque el artículo de revisión presentado en el **Capítulo 5** ya incluye la discusión acerca de numerosos aspectos relacionados con estas nuevas técnicas de ablación de FA con bases mecanicistas, algunos aspectos controvertidos no pudieron ser tratados con mucha profundidad en el mismo, bien por cuestiones de límite de palabras, bien porque hacen referencia a publicaciones posteriores al momento de escribirlo. Por ello, el apartado 6.3 pretende ser una ampliación de la discusión que allí se escribió, ofreciendo más puntos de vista sobre este controvertido tema.

## 6.1 Acerca del cartografiado óptico

En el **Capítulo 5** ya se han descrito los diferentes métodos de cartografiado de potenciales cardíacos, analizando sus pros y sus contras. En los siguientes epígrafes se comentan en más profundidad cuestiones de interés específicas del cartografiado óptico de potenciales cardíacos, como los requisitos temporales y espaciales en el desarrollo de un sistema de este tipo, el tipo de detector más apropiado, aspectos referentes al filtrado, etc. Por último se discuten las limitaciones que posee la técnica.

### 6.1.1 Microelectrodos vs Cartografiado óptico

En la señal generada con CO no se pueden medir valores absolutos de tensión transmembrana como sí se puede hacer por ejemplo con los microelectrodos. Esto se debe a que lo que se mide con el CO son las variaciones de la intensidad de fluorescencia relativas a la fluorescencia de fondo (la emitida con la membrana polarizada). Lo que sí se ha demostrado es que la forma y la temporización de los potenciales de acción ópticos mimetizan con bastante fidelidad los potenciales registrados mediante microelectrodos.<sup>6</sup>

Sin embargo se han comprobado ciertas diferencias, sobre todo en la duración de la fase 0 del potencial de acción que es mayor en los potenciales de acción ópticos que en los obtenidos mediante microelectrodos. Se han publicado varios artículos que intentan explicar los motivos de este fenómeno,<sup>46-49</sup> aunque el fundamental ya se comentó en la introducción: cada potencial de

acción óptica no proviene de una única célula, sino de un conjunto de las mismas. Por lo demás, en todos los casos en que se ha comprobado, los potenciales de acción ópticos registrados bajo una gran variedad de cambios en las concentraciones iónicas del medio (p.e. cambios en la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , o  $\text{Na}^+$ , o adición de  $\text{Cd}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$ ), o mediante la adición de fármacos (bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\beta$ -adrenérgicos etc.), han reflejado los mismos cambios en la forma y duración del potencial de acción que los registrados con microelectrodos.<sup>7</sup>

Por lo tanto, los potenciales de acción registrados ópticamente proporcionan un método para establecer la temporización en la despolarización (fase 0 del potencial de acción) y repolarización (resto del potencial de acción), y nos permiten descubrir detalles importantes en la forma de los potenciales de acción, lo cual es de gran utilidad para el estudio de las arritmias cardíacas. Por supuesto, una ventaja principal del CO sobre la técnica de los microelectrodos es que se puede adquirir información de la actividad celular en un gran número de sitios (píxeles) simultáneamente. Esto permite examinar la propagación de los frentes eléctricos durante las arritmias de una manera que no es posible con los microelectrodos.

### 6.1.2 Cartografiado óptico vs cartografiado eléctrico

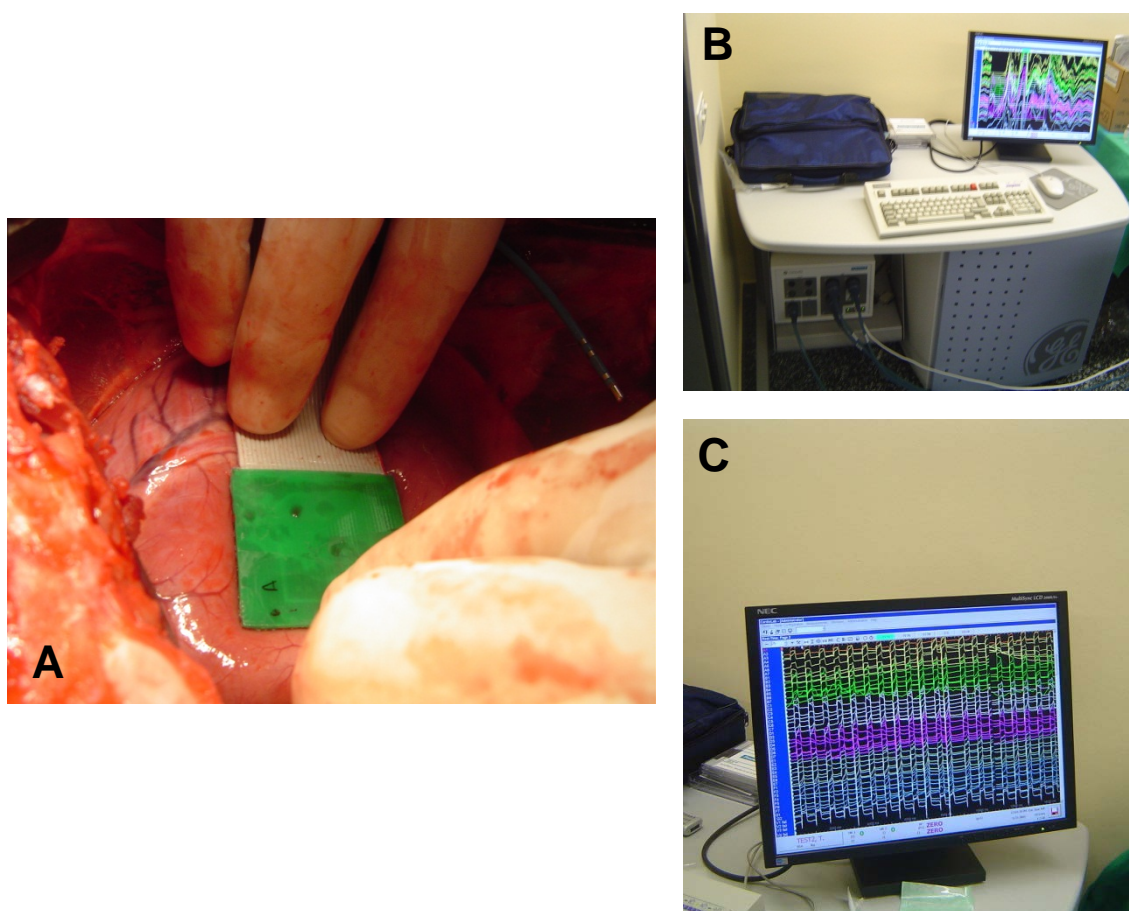
Con las técnicas de cartografiado cardíaco (eléctrico y óptico), se puede medir la actividad eléctrica cardíaca simultáneamente en decenas, cientos o miles de puntos del tejido, lo cual ofrece una herramienta muy potente para el estudio de arritmias complejas, como por ejemplo la fibrilación auricular o ventricular. Con la técnica de cartografiado eléctrica, esta actividad eléctrica se mide con electrodos situados sobre el tejido miocárdico, y muchas veces estos electrodos están agrupados formando una placa de registro. Las señales eléctricas adquiridas son registradas, digitalizadas y almacenadas habitualmente con ayuda de un polígrafo, como se muestra en la **Figura 28**.

En concreto, si comparamos ambas técnicas, el CO tiene 3 ventajas principales sobre el cartografiado eléctrico:

1. Se pueden registrar muchas más señales simultáneamente (tantas como elementos de registro tenga el detector). En la cámara utilizada en los **Capítulos 3 y 4** de esa Tesis, el sensor tenía  $64 \times 64 = 4096$  píxeles o elementos de registro simultáneos, frente a los  $8 \times 8 = 64$  electrodos de nuestra placa. Esto hace que el CO disponga de una mucho mayor resolución espacial que el eléctrico.
2. Los potenciales de acción ópticos tienen información evidente sobre la repolarización de las células, algo que es más difícil de obtener en las señales adquiridas con cartografiado eléctrico, ya que al tratarse de potenciales extracelulares, sí se observa claramente la activación, pero no tanto la

repolarización, aunque es cierto que con las señales eléctricas se puede obtener una estimación de la duración del potencial de acción mediante el intervalo de activación-recuperación.<sup>98-101</sup> Esta información de repolarización es de gran utilidad para el estudio de las arritmias cardíacas.

3. Las señales ópticas no se ven afectadas por los artefactos eléctricos que introducen los estimuladores y los desfibriladores al aplicar pulsos en el primer caso o descargas de desfibrilación en el segundo.



**Figura 28.** Ejemplo de cartografiado eléctrico. **A:** Placa epicárdica de 64 pines (8 x 8 electrodos), aplicada sobre corazón de cerdo *in vivo* para el registro de la actividad eléctrica en la zona bajo la placa. **B:** Polígrafo Prucka CardioLab II de General Electric utilizado en nuestro laboratorio para el registro de las señales eléctricas epicárdicas. **C:** Detalle de la pantalla del polígrafo mostrando algunas de las 64 señales eléctricas que estaban siendo registradas simultáneamente con la placa epicárdica.

Pero a pesar de estas limitaciones, no hay que desechar ni mucho menos el cartografiado eléctrico, ya que es de gran utilidad para el registro de potenciales extracelulares en la superficie cardíaca *in vivo* (algo que no es muy viable con el cartografiado óptico), o incluso es capaz de realizar mediciones intramurales.<sup>72</sup> Esto es bastante más complicado de realizar técnicamente con CO debido a que las medidas ópticas están limitadas a la superficie del miocardio ya que la luz sólo penetra en el tejido aproximadamente entre 300 y 500  $\mu\text{m}$ .<sup>48</sup> Se han realizado intentos de registrar potenciales de acción ópticos en zonas internas del músculo cardíaco por medio de la transiluminación,<sup>41</sup> o cortando cuñas de músculo para dejar al descubierto las células internas del miocardio.<sup>102, 103</sup> Sin embargo, quizá el mayor avance en estos intentos, se ha dado con un sistema que inserta múltiples fibras ópticas en el miocardio.<sup>42-45</sup> Recientemente, el uso de nuevos tintes que emiten en el infrarrojo cercano y para los que el tejido cardíaco es algo más transparente,<sup>10</sup> han permitido el registro de potenciales subepi y subendocárdicos.<sup>51</sup> Sin embargo, aunque dichos tintes aportan información de capas algo más profundas del tejido que con los tintes clásicos, no se puede considerar como una técnica de adquisición intramural verdadera.

Una de las limitaciones principales del cartografiado eléctrico es que no es capaz de medir potenciales transmembrana, aunque ha habido intentos de conseguir registrar potenciales de acción por medio de electrodos extracelulares basándose en las corrientes de lesión, o en electrodos de succión. Se han conseguido registrar señales eléctricas con forma de potencial de acción usando este tipo de electrodos. Son los llamados potenciales de acción monofásicos (MAP son sus siglas en inglés).<sup>104-108</sup> Sin embargo, su obtención en la práctica es bastante complicada por diversos motivos fundamentalmente prácticos.

Además, como hemos dicho, no es posible registrar con electrodos los efectos de los choques de desfibrilación debido a que el enorme artefacto eléctrico de la desfibrilación camufla la actividad eléctrica celular subyacente, y además los electrodos pueden modificar el mecanismo de acción de la desfibrilación. Por ello, para el estudio de estos mecanismos de acción a nivel celular, es de mucha mayor utilidad el CO, que evita estos problemas ya que permite registros sin necesidad de contacto físico con el tejido, evitando así los artefactos de estimulación y de desfibrilación. El CO ha aportado información de interés de por qué un choque de desfibrilación tiene éxito, o por el contrario, fracasa.<sup>109-120</sup>

Por otra parte, el CO, puede requerir el uso de desacopladores electro-mecánicos para inhibir la contracción muscular que introduce el llamado artefacto de movimiento. El uso de estos desacopladores electromecánicos puede afectar la actividad electrofisiológica cardíaca.<sup>121</sup> Además, el CO requiere en principio explantar el corazón, por lo que no permite estudios *in vivo*, y aunque fuera posible, la potencial toxicidad de los tintes sensibles a potencial de membrana, eliminan su posible aplicación clínica directa. El cartografiado eléctrico sin embargo sí es aplicable *in vivo*, y no requiere el uso de ninguna molécula tóxica. De hecho los cartografiados

intracavitarios realizados con catéteres durante los estudios electrofisiológicos, no son más que versión de cartografiado eléctrico, en la que en lugar de adquirir señales de muchos puntos a la vez, se obtienen una a una moviendo el catéter. En muchas ocasiones, se reconstruye la secuencia de activación con software externo de sistemas como Carto (Biosense Webster), NavX (St. Jude Medical) o Rhythmia (Boston Scientific). Las últimas versiones de todos ellos, además permiten la adquisición de múltiples señales de manera simultánea mediante el uso de catéteres o sistemas especiales multielectrodo como el *Pentarray* (Biosense Webster), el EnSite (St. Jude Medical) o el catéter *basket Constellation* o el mini-basket de 64 polos *IntellaMap Orion* (Boston Scientific).

En cualquier caso, es razonable suponer que la complementariedad de las dos técnicas de cartografiado conducirá a métodos para aplicar ambas simultáneamente. Ya se han realizado algunos desarrollos que lo intentan. Por ejemplo, mediante el uso de electrodos transparentes que puedan registrar señales eléctricas sin bloquear la iluminación y la fluorescencia asociadas al CO.<sup>122</sup>

### 6.1.3 Requisitos de resolución temporal y espacial y elección del detector apropiado

Teóricamente, el contenido frecuencial de un potencial de acción óptico determina la frecuencia de muestreo temporal mínima requerida para reconstruir de manera precisa el potencial de acción a partir de las muestras tomadas.<sup>7</sup> Como el potencial de acción óptico representa el promedio de varias células, el contenido frecuencial de un potencial de acción registrado con microelectrodos se espera que sea más importante a altas frecuencias (deflexiones temporales con más pendiente), y por tanto se puede usar como límite superior para el cálculo de la frecuencia de muestreo requerida para un potencial de acción óptico. La teoría de muestreo exige una frecuencia de muestreo al menos del doble de la mayor componente frecuencial de la señal para poder reconstruir la señal original (teorema de Nyquist), ya que de otra forma se produciría un fenómeno denominado *aliasing* (solapamiento de réplicas espectrales).<sup>123</sup> Hay estudios en los que se ha comprobado que más del 90% de la energía de los potenciales de acción ventriculares se concentra en frecuencias inferiores a los 150 Hz. En cualquier caso, no todas las partes del corazón generan potenciales de acción con semejante contenido espectral. Por ejemplo, si la preparación a analizar contiene fibras de Purkinje, puede haber potenciales de acción con componentes frecuenciales a frecuencias más elevadas, y por tanto requerir frecuencias de muestreo más elevadas, que en las zonas de ventrículo normal. En la práctica se utilizan frecuencias de muestreo que satisfacen sobradamente los requisitos del teorema de muestreo. Por ejemplo, en nuestro laboratorio usamos una frecuencia de muestreo de entre 300 y 1000 Hz (imágenes por segundo). En cualquier caso, hay que tener en cuenta que el “promediado temporal” que se efectúa en muchas ocasiones para reducir el ruido, disminuye la frecuencia de muestreo efectiva, con lo que se pueden perder algunos detalles de alta frecuencia.



Al igual que en el dominio del tiempo, la complejidad espacial de los frentes de onda que se propagan dicta la resolución espacial requerida. Por ejemplo, se necesita una mejor resolución espacial cuando se analizan los frentes de onda complejos generados en las reentradas durante la fibrilación auricular o ventricular, o para investigar la propagación discreta a nivel celular. Sin embargo, a menudo es difícil saber a priori la complejidad espacial de los frentes de onda, y de esta manera poder determinar un límite superior e inferior de la resolución espacial requerida. Independientemente de la complejidad del frente de onda, cuando un sensor CCD, CMOS o un array de fotodiodos PDA se utilizan con resoluciones espaciales mayores de 1 mm, hay muchas células contribuyendo a cada potencial de acción óptico, y esto lleva a un alargamiento de la fase 0 del potencial de acción. Por ello, no es recomendable una resolución espacial mayor de 1 mm.<sup>7</sup> Además, es importante darse cuenta de que con independencia de la resolución espacial, una frecuencia de muestreo temporal insuficiente, hace imposible seguir correctamente la propagación de los frentes de onda, en tiempo y en espacio. En cualquier caso, a pesar de las dificultades para determinar la resolución espacial necesaria, una de las ventajas del CO es que la resolución espacial se puede cambiar simplemente cambiando la lente de una cámara, que determina el tamaño de la región explorada.<sup>7</sup> Cuanto mayor sea la región enfocada, peor será la resolución espacial, ya que cada píxel corresponderá a una región más grande de tejido.

De todas formas, hay que tener en cuenta que la elección del fotodetector puede limitar en algunos casos la resolución temporal y espacial que se pueden conseguir. Un detector CCD o CMOS típico tiene varios órdenes de magnitud más elementos de registro de los que tiene un array de fotodiodos. En la práctica, sin embargo, el número de elementos de registro (píxeles) efectivos es mucho menor, debido al filtrado espacial mediante máscara (que no deja de ser un promediado) y el *pixel binning* que se utilizan habitualmente para mejorar la SNR con el objetivo de que alcance un nivel aceptable. A pesar de ello, el número efectivo de píxeles en un detector CCD sigue siendo considerablemente mayor que en un PDA, y por lo tanto, los detectores CCD o CMOS son más apropiados para mapear áreas grandes (factor de aumento de la lente bajo) manteniendo resoluciones espaciales de 1 mm o mejores. Por contra, las características de baja SNR y baja frecuencia de muestreo que se consiguen con un detector CCD en comparación con los que se pueden obtener con un array de fotodiodos, los hacen inapropiados cuando el nivel de señal es muy bajo, como ocurre si la región estudiada es muy pequeña y sólo las células en un área muy pequeña de tejido contribuyen a la fluorescencia registrada en un píxel (lo que ocurre cuando se trabaja con factores de aumento altos de la lente), que hacen que la fuente de los potenciales de acción sea pequeña, haya poco nivel de señal, y el contenido frecuencial de los potenciales de acción ópticos se aproxime al medido de una sola célula con microelectrodos.<sup>7</sup>

Los arrays de fotodiodos, contienen un número menor de elementos, y no son capaces de alcanzar los requisitos mínimos de resolución espacial requeridos cuando se trabaja con

preparaciones grandes. Por ello han quedado prácticamente en desuso en la actualidad. Sin embargo, las altísimas frecuencias de muestreo y la SNR que se puede alcanzar con ellos, los convierte en la mejor elección cuando se trabaja con factores de magnificación de la lente muy elevados, y cuando la resolución temporal y la fidelidad de la señal son factores críticos.<sup>7</sup>

En los trabajos presentados en los **Capítulos 3 y 4** de esta Tesis, se utilizó un sensor CCD, que permite valores muy aceptables de resolución temporal (300 fps en el **Capítulo 4** y 800 fps en el **Capítulo 3**) y espaciales (64x64 píxeles para regiones cuadradas de entre 20 y 40 mm de lado, lo que da resoluciones espaciales antes de filtrado de entre 0.3 y 0.6 mm).

#### **6.1.4 Mejorando la SNR: Filtrado vs Promediado**

Se han realizado análisis del efecto que tienen los filtrados lineales, tanto espaciales como temporales, sobre las películas de activación y los potenciales de acción ópticos subyacentes. El filtrado espacial elimina el ruido “asíncrono” producido por el dispositivo de registro (es decir, el ruido incorrelado con la temporización de la adquisición), mientras que el filtrado espacial elimina el ruido “síncrono” producido por la luz de excitación, que es uniforme para cada imagen, pero que varía entre imágenes debido a fluctuaciones en la iluminación (como por ejemplo el ruido de la red remanente -50 ó 60 Hz- y sus armónicos).<sup>17</sup> La aplicación de ambos tipos de filtrado puede mejorar enormemente la SNR, de manera equivalente al promediado de cientos de potenciales de acción ópticos.<sup>17</sup>

Esta combinación de filtrados espaciales y temporales, tiene gran importancia y mucha más flexibilidad de uso que el promediado de potenciales de acción. Basta pensar en cualquier arritmia que no tiene un desarrollo temporal regular: en situaciones de este tipo el promediado se complica enormemente, ya que los potenciales de acción no estarán equiespaciados en el tiempo, con lo que se dificulta la selección del margen apropiado para promediar. Pero lo más grave no es eso, sino que con las arritmias, varía la morfología de los potenciales de acción dentro de un mismo registro, pudiendo cambiar sobremanera la duración de los mismos, su amplitud, la duración de su fase 0, etc. Esto hace imposible el promediado de los potenciales de acción consecutivos en el tiempo, ya que unos y otros pueden no parecerse en nada.

Por ello el promediado de potenciales de acción, sólo tiene sentido en ritmos estimulados, donde la temporización es muy estricta porque viene dictada por el estimulador cardiaco que actúa a modo de marcapasos, consiguiendo potenciales de acción equiespaciados en el tiempo, y con características muy parecidas entre unos y otros. Incluso en esta situación muchas veces no sería posible utilizar promediado, debido a que los registros efectuados no contienen el número suficiente de potenciales de acción como para que la mejora por promediado sea sustancial. Recordemos que no conviene realizar registros demasiado largos, ya que la iluminación continuada con altas intensidades de luz, necesarias para la obtención de

estas películas, acelera los efectos de fotoblanqueamiento y el efecto fotodinámico, lo que desemboca en una degradación progresiva de la preparación bajo estudio.<sup>15</sup>

Sin embargo, la combinación de filtrados espaciales y temporales no tiene ninguno de estos problemas, ya que puede realizarse incluso con un único potencial de acción, o con secuencias de los mismos en las que hay una gran variabilidad entre unos y otros, sin resentirse en modo alguno, y esto es especialmente importante en el estudio de las arritmias. Es por ello, que en los trabajos presentados en los **Capítulos 3 y 4** de esta Tesis, se utilizó una combinación de filtrado temporal y espacial para mejorar la SNR de los registros ópticos.

### **6.1.5 Limitaciones del cartografiado óptico**

#### **Imposibilidad de obtener medidas “absolutas” de potencial transmembrana**

La respuesta óptica dependiente del potencial transmembrana proporciona una medida detallada de la forma y la cinética de los potenciales de acción cardíacos, pero no una medida “directa” del valor real del potencial transmembrana. Todos los intentos para lograr una “calibración” del potencial de membrana usando tintes que responden con rapidez a los cambios del potencial han fallado debido a la naturaleza y origen de estas respuestas.<sup>7</sup> La fluorescencia basal se debe a que el tinte se liga al tejido y depende del aparataje óptico utilizado (sobre todo de los filtros ópticos de excitación y emisión). Pueden darse las siguientes situaciones con las moléculas del tinte: i) pueden fijarse en la matriz extracelular, ii) pueden fijarse a la membrana de los cardiomiocitos (la situación deseada), iii) pueden fijarse a las células endoteliales de los alrededores, iv) pueden internalizarse en el citoplasma de las células.<sup>7</sup> El espectro de absorción y emisión del tinte dependen del entorno local, de tal manera que sólo las moléculas de tinte asociadas con membranas excitables como las de los cardiomiocitos, actuarán como transductor de los cambios en el potencial de membrana a respuestas ópticas. El cambio relativo en la fluorescencia  $\Delta F/F$  debido al potencial de acción, depende de la “sensibilidad” del tinte al voltaje, de la fracción de moléculas de tinte que están ligadas a moléculas excitables, y de la suma de los potenciales de acción de todas las células vistas por el detector.<sup>7</sup>

En principio, el  $\Delta F/F$  registrado durante un potencial de acción, se puede relacionar con la despolarización de las células cardíacas (es decir, aproximadamente unos 100 mV, de -90 mV a +10 mV). Sin embargo, la situación es más compleja, ya que la fluorescencia basal tiende a cambiar su valor a menudo. La explicación más probable para esto está en el lavado del tinte por efecto de la circulación continua del Tyrode en el sistema Langendorff, y en el efecto de fotoblanqueamiento.<sup>15</sup> Durante la exposición a la luz, el lavado y la fotodescomposición del tinte, producirían un decremento de la fluorescencia basal, que tiene como consecuencia un incremento en la amplitud del potencial de acción óptico. Por esta razón, la fluorescencia basal no depende estrictamente del potencial de reposo de la membrana, y el cambio relativo de fluorescencia debido al potencial de acción,  $\Delta F/F$ , es proporcional al cambio en el potencial de membrana, pero el coeficiente de proporcionalidad varía a lo largo del tiempo de una forma no

cuantificable.<sup>7</sup> Por ello, este tipo de tintes miden la cinética de los potenciales de acción, pero los cambios de voltaje sólo se pueden deducir de registros de los potenciales de acción mediante técnicas ópticas y con microelectrodos simultáneas.

### **Imposibilidad de estudiar la influencia del sistema nervioso autónomo en las arritmias cardíacas**

En los sistemas de CO que trabajan sobre un corazón entero, la principal diferencia con un corazón *in vivo*, es decir, sin haber sido explantado, es que en el caso del CO el sistema nervioso autónomo no tendrá ninguna influencia sobre el corazón (por ejemplo sobre el nodo sinusal para fijar la frecuencia cardíaca). El nodo sinusal está muy innervado, y por tanto, muy influenciado por el sistema nervioso autónomo. Esto impide estudiar mediante CO la influencia de los sistemas simpático y parasimpático sobre el corazón, y las arritmias que pueden llegar a generar. Además, aunque tiene sus limitaciones, si se quiere estudiar una situación de activación del sistema simpático, se puede inyectar en el Tyrode epinefrina o algún adrenérgico similar, y viceversa si se quiere estudiar una situación vagal (activación del sistema parasimpático).

### **Precisión en la medida de la duración de la fase 0**

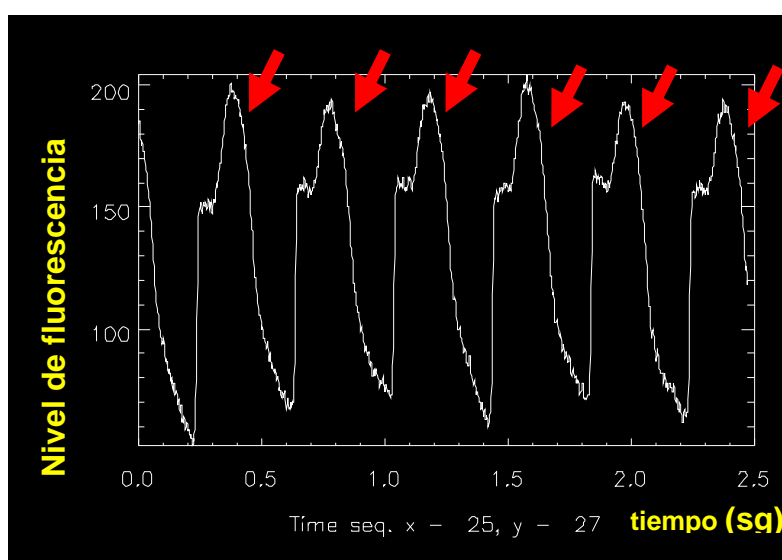
Aunque la respuesta de los tintes sensibles a voltaje como el Di-4-ANEPPS es lo suficientemente rápida como para actuar de transductor de la tensión transmembrana, y la fluorescencia emitida sigue con precisión los cambios en el potencial de acción, debemos recordar que los potenciales de acción obtenidos de preparaciones de elevado grosor (por ejemplo las de corazón completo), se diferencian significativamente de los registrados con microelectrodos, sobre todo en la duración de la fase 0. Esto se debe a que la luz adquirida por el sensor se origina de un volumen de músculo que corresponde a una cierta área de tejido (que depende del factor de aumento de la óptica), pero también a una cierta profundidad.<sup>7</sup> Sabemos que cuanto mayor es el factor de aumento, menor es el área que contribuye a la generación del potencial de acción óptico, y que por tanto, este sigue de manera más precisa al obtenido con microelectrodos. Sin embargo, ahí no acaba el problema, ya que en la generación de los potenciales de acción ópticos también influye la luz del tejido adyacente (incluso del exterior de la región filmada) que llega al detector. Por ello, y aunque el factor de aumento de la lente sea muy elevado, no se conseguirá seguir la evolución temporal de los potenciales de acción con la misma precisión de los microelectrodos, especialmente en su fase 0.

### **Artefacto de movimiento**

Uno de los problemas más frustrantes asociados con el CO es el artefacto de movimiento debido a la contracción del corazón. El artefacto de movimiento se produce por cambios en las propiedades de reflectancia del tejido cuando el corazón se contrae, y por cambios en la fuente de fluorescencia asociada con el movimiento del tejido que corresponde a cada elemento de registro (fotodiodo en PDA, píxel en un sensor CCD o CMOS). Típicamente la fase 0 del potencial de acción óptico no se ve muy afectada por el artefacto de movimiento ya que la

contracción no ha comenzado aún. Por el contrario, el *plateau* y la fase de repolarización del potencial de acción aparecen distorsionadas, haciendo difícil determinar la temporización correcta de la repolarización, a menos que se tomen las medidas apropiadas.

Actualmente, las aproximaciones más frecuentes para minimizar el artefacto de movimiento incluyen: i) administración de fármacos que inhiben la contracción mecánica, es decir, que producen un desacoplamiento entre la actividad eléctrica y la actividad mecánica del corazón (desacopladores electromecánicos), ii) reducción de la concentración extracelular de calcio, iii) limitación mecánica del movimiento de la zona bajo estudio mediante presión contra una pared transparente.



**Figura 29.** Ejemplo de potenciales de acción ópticos con un claro artefacto de movimiento, señalado por las flechas rojas.

Ninguna de estas técnicas es ideal. La supresión farmacológica de la contracción usando fármacos como el *2,3-butanedione monoxime*, el verapamilo, la Cytochalasina-D, o la reducción del calcio extracelular pueden producir efectos electrofisiológicos colaterales no deseados.<sup>121</sup> Por el contrario, la inmovilización mecánica mediante suave presión de la zona bajo estudio no parece producir efectos electrofisiológicos adversos, pero no elimina el artefacto de movimiento totalmente, y además puede producir isquemia en la zona bajo presión, en cuyo caso sí se ven afectadas las propiedades electrofisiológicas del tejido. Como ninguno de estos métodos es del todo satisfactorio, se han evaluado otras posibilidades, como por ejemplo utilizar un sistema que funciona con dos longitudes de onda en modo ratiométrico.<sup>31, 38, 45, 124, 125</sup> Este método se basa en medidas simultáneas de señal fluorescente en dos rangos de longitud de onda diferentes: uno en el que el tinte muestra una gran respuesta al potencial de acción, y otro donde el tinte tiene una respuesta invertida al potencial de acción, o simplemente no tiene respuesta. El cociente o la diferencia de estas dos señales, permitiría obtener una señal óptica libre de artefactos de

movimiento (o al menos los reduciría de manera importante), además de reducir otros efectos indeseables como el *photobleaching*. Pero este método no resulta del todo satisfactorio, pues sólo funciona bien con contracciones musculares débiles, y con tintes con unas determinadas características espectrales. Existen también sistemas que intentan realizar un seguimiento de cada punto de tejido a lo largo del tiempo en la imagen para después realizar la corrección pertinente.<sup>126</sup>

Parecía que la solución a esta limitación del cartografiado óptica había venido con la aparición del nuevo desacoplador electromecánico blebbistatina.<sup>127</sup> La blebbistatina se consideró durante unos años como libre de efectos colaterales indeseables como los producidos por el BDM o la cytochalasina D (alteración de la morfología del potencial de acción y la velocidad de propagación en el tejido, cambios en la vulnerabilidad a las arritmias ventriculares, etc.).<sup>121</sup> Sin embargo, publicaciones recientes ponen en duda la carencia de efectos electrofisiológicos de la blebbistatina.<sup>128</sup> Además, parece que precipita y forma microcristales modificando los patrones de microcirculación.<sup>129</sup> Por otro lado, un problema adicional de la blebbistatina es que reduce los efectos electrofisiológicos del estiramiento miocárdico,<sup>130</sup> lo que hubiera confundido las medidas obtenidas con altas presiones intraventriculares en el trabajo presentado en el **Capítulo 3**. Otro hallazgo que sugiere que la blebbistatina modifica los efectos electrofisiológicos de la dilatación de cavidades en cerdo es que la FA inducida por estiramiento finaliza casi instantáneamente cuando se añade blebbistatina a la perfusión (David Filgueiras-Rama, observaciones no publicadas). Por todos estos motivos, decidimos no usar desacoplador electromecánico en nuestros experimentos y confiamos en una aproximación mecánica para reducir el artefacto de movimiento mediante compresión suave de la superficie filmada del corazón contra una ventana en el recipiente de superfusión, únicamente durante el tiempo necesario para grabar la tanda de películas en cada configuración experimental. Hay que tener en cuenta además que durante FV (**Capítulo 4**) el artefacto de movimiento es mínimo ya que no hay contracción efectiva de los ventrículos.

### Otras limitaciones

El CO requiere explantar el corazón, por lo que no permite estudios *in vivo*, y aunque fuera posible con ciertos sistemas que guían la luz a través de fibras ópticas,<sup>131-133</sup> la potencial toxicidad de los tintes sensibles a potencial de membrana, eliminan su posible aplicación clínica directa.<sup>7</sup>

Sin embargo, las limitaciones descritas, aunque importantes, no han imposibilitado el uso del CO en muchas situaciones, con el consiguiente avance en el conocimiento de las arritmias cardíacas (iniciación, mantenimiento y terminación de las mismas) y su aplicación para el estudio de terapias antiarrítmicas.

## 6.2 Actualización de la discusión acerca de los mecanismos de la FV

### 6.2.1 Papel de las corrientes rectificadoras de potasio en la FV

Varios modelos experimentales usando corazones de animal grande, incluyendo el presentado en el **Capítulo 4** de esta Tesis, han mostrado un papel clave de las corrientes rectificadoras de potasio ventriculares ( $I_{K1}$ <sup>70, 80, 134-136</sup> e  $I_{KATP}$ <sup>26</sup>) en el mantenimiento de la FV y en el control de su frecuencia máxima de activación. Estos hallazgos parecen estar relacionados con la importante influencia de estas corrientes en la dinámica de los rotores.

En lo que se refiere al papel de la  $I_{K1}$ , su modulación de la dinámica de los rotores es clara. Ha sido estudiada de manera muy extensa en corazón de pequeño mamífero por el grupo de Jalife.<sup>47, 70-72</sup> Además, las interacciones  $I_{K1}$ - $I_{Na}$  parecen influir de manera determinante en la frecuencia de los rotores responsables de la actividad reentrante por medio de una modulación recíproca de la expresión de las proteínas de sus respectivos canales dentro de un complejo macromolecular.<sup>137</sup>

Los iones de bario en baja concentración se utilizan a menudo en experimentos *in vitro* o *ex vivo* para producir un bloqueo relativamente específico de la  $I_{K1}$ .<sup>135, 138</sup> Sin embargo, este ión no puede ser usado en animales o humanos *in vivo* debido a sus efectos extra-cardiacos.<sup>139</sup> Por ejemplo, nuestro grupo ha comprobado previamente el papel de la  $I_{K1}$  en 8 corazones de cerdo perfundidos bloqueando dicha corriente con  $BaCl_2$  (5 y 50  $\mu M$ ). Aunque dichos resultados no se han mostrado en esta tesis, ni han sido publicados, observamos una disminución generalizada de las frecuencias de activación y dominios más grandes en comparación con la FV basal, pero, en contra de lo observado en corazón de cobaya, en el corazón porcino la FV no revirtió espontáneamente en ninguno de los 8 corazones, ni siquiera usando una concentración de 50  $\mu M$ .

Además, muchos de los efectos cardiacos de la  $I_{K1}$  no se han evaluado en detalle en modelos de animal grande *in vivo*, o en humanos debido a la ausencia de un inhibidor específico cardiaco de la  $I_{K1}$ . Por ello, se necesitan compuestos tolerables *in vivo* para manipular específicamente la  $I_{K1}$  cardiaca en animales y humanos. En este sentido, un estudio reciente ha descrito un inhibidor específico de la  $I_{K1}$  cardiaca eficiente<sup>139</sup> que podría ser probado en mamíferos grandes e incluso en corazón humano aislado.

### 6.2.2 Canales de potasio sensibles al ATP ( $K_{ATP}$ ). Efecto anti-fibrilatorio del bloqueo de los canales $K_{ATP}$

Ya hemos hablado de una de las corrientes rectificadoras de potasio en el ventrículo ( $I_{K1}$ ). Hablemos ahora de la otra:  $I_{KATP}$ . Los canales  $K_{ATP}$  del sarcolema se componen de una subunidad formadora del poro ( $K_{ir}6.1$  o  $K_{ir}6.2$ ) y un receptor de sulfonilurea (SUR1, SUR2A, o

SUR2B). Las subunidades SUR determinan la especificidad y la selectividad de los agonistas y antagonistas de los  $K_{ATP}$ .<sup>140</sup>

El papel de la corriente rectificadora de potasio  $I_{KATP}$  en la FV se ha puesto de manifiesto en un estudio reciente con corazones humanos con cardiopatía durante isquemia global.<sup>82</sup> En ese estudio, se concluyó que el bloqueo de los canales  $K_{ATP}$  durante la FV promovió la desfibrilación espontánea mediante la atenuación de la dispersión de la refractariedad espacio-temporal isquemia-dependiente durante las fases iniciales de la FV. Según los autores, la base molecular de estos resultados probablemente involucre una expresión heterogénea y alterada de las subunidades de los canales  $K_{ATP}$  en corazones con cardiopatía.<sup>82</sup> Pero es importante señalar que este estudio careció de un grupo de control de corazones normales. De hecho, estudiaron el efecto de la modulación de los canales  $K_{ATP}$  en isquemia aguda en corazones humanos con cardiopatía aislados, pero puesto que la expresión del ARNm relativa de subunidades de los  $K_{ATP}$  es también diferente en los corazones normales y en los enfermos, el efecto de la modulación de los canales  $K_{ATP}$  en los corazones normales necesitaría más investigación.<sup>82</sup>

Otro estudio usando cuñas de ventrículo izquierdo humano normal o con insuficiencia cardiaca intentó abordar este tema analizando la sensibilidad de estas cuñas a la apertura farmacológica de los canales  $K_{ATP}$ .<sup>140</sup> El efecto del pinacidil (especificidad sobre SUR2A>SUR1) en la duración del potencial de acción fue significativamente más alta que la del diazóxido (especificidad sobre SUR1>SUR2A) en ambos grupos. Durante la perfusión con pinacidil, la estimulación en ráfaga indujo fibrilación en todas las preparaciones de ventrículo izquierdo con frecuencias dominantes de  $17.5 \pm 5.1$  Hz. La glibeclamida ( $10 \mu M$ ) terminó estas arritmias y restauró la duración del potencial de acción a sus valores basales. El remodelado en respuesta a la insuficiencia cardiaca crónica o a un infarto previo potenció el acortamiento de la duración del potencial de acción inducido por el diazóxido.<sup>140</sup> Sin embargo, no se encontró una expresión aumentada de SUR1 en los corazones enfermos. Lo que sí encontraron fue una expresión globalmente mayor de SUR2A que de SUR1 en ambos tipos de tejido, lo que es consistente con su observación de que en general, el pinacidil tiene un efecto más importante sobre la duración del potencial de acción que el diazóxido. La expresión de ARNm de los  $K_{ir6.1}$  y  $K_{ir6.2}$  de los  $K_{ATP}$  fue significativamente mayor en el tejido ventricular sano que en el enfermo.<sup>140</sup> Sin embargo, en este estudio, la FV no se estudió a nivel de corazón completo, ni bajo isquemia global.

Estos resultados pueden indicar que el bloqueo de los canales  $K_{ATP}$  podría promover la desfibrilación espontánea no sólo en corazones con cardiopatía,<sup>82</sup> sino también en corazones normales. Esto podría explicar la incidencia reducida de FV en pacientes diabéticos no insulino-dependientes tratados con glibenclamida, con<sup>141</sup> o sin<sup>79, 80</sup> insuficiencia cardiaca.

Además, hasta donde nosotros sabemos, no se ha llevado a cabo aún un análisis detallado del papel de los canales  $K_{ATP}$  en la FV humana en corazones normales en presencia de



isquemia global. Así, el estudio del papel de  $I_{K_{ATP}}$  e  $I_{K_1}$  y de las diferentes fases de la FV humana con alta resolución espacio-temporal en el contexto de isquemia global podría ser de gran relevancia, donde el efecto individual de la apertura de los canales  $K_{ATP}$  (un número reducido de rotores estables simultáneos y detectables epicárdicamente como hemos descrito en el **Capítulo 4**<sup>26)</sup> podría interaccionar con los efectos de múltiples variables como valores altos de potasio extracelular, bajo pH, etc.<sup>142</sup>

Para lograr este objetivo, el uso de un bloqueante de los canales  $K_{ATP}$  (como la glibenclamida) podría ser muy útil. Sin embargo, si se usa clínicamente, la glibenclamida puede producir hipoglucemia en pacientes normoglucémicos. Además, el bloqueo de los canales  $K_{ATP}$  puede contrarrestar el preconditionamiento isquémico y agravar el daño por isquemia aguda.<sup>143</sup>

### **6.2.3 Hay algún bloqueador efectivo y específico de los canales $K_{ATP}$ del sarcolema?**

En principio, podría ser posible retener el efecto antiarrítmico del bloqueo de los canales  $K_{ATP}$  sin sus consecuencias adversas para la cardioprotección mediante el bloqueo selectivo de los canales  $K_{ATP}$  del sarcolema, los cuales median en los cambios del potencial de acción dejando intactos los canales  $K_{ATP}$  de la mitocondria, que son centrales en el preconditionamiento.<sup>82</sup> Para ello, podrían usarse fármacos selectivos de los canales  $K_{ATP}$  del sarcolema cardiaco. Los compuestos HMR 1883 (o su sal de sodio HMR 1098) o el HMR 1402 han mostrado bloquear selectivamente los canales  $K_{ATP}$  del sarcolema cardiaco.<sup>144</sup> Estas drogas atenuaron los cambios inducidos por la isquemia en las propiedades eléctricas cardiacas y evitaron arritmias malignas sin los efectos indeseables de otras drogas. Como los canales  $K_{ATP}$  sólo se activan cuando los niveles de ATP bajan, estas drogas tienen la ventaja añadida de que sólo tendrían efecto en el tejido isquémico y tendrían poco o ningún efecto sobre el tejido sano. Por ello, los antagonistas selectivos de los canales  $K_{ATP}$  en la superficie de las células cardiacas podrían representar una nueva clase de medicación antiarrítmica selectiva para tejido isquémico.<sup>144</sup>

Sin embargo, existe controversia sobre la eficacia y la especificidad de estos compuestos. De hecho, un estudio ha mostrado una baja efectividad del HMR 1098 en el bloqueo de los canales  $K_{ATP}$  del sarcolema cardiaco durante estrés metabólico.<sup>145</sup> Además, otro estudio que usaba miocitos de ratón concluyó que el HMR 1098 redujo una inhibición más potente de los canales  $K_{ir6.2}/SUR1$  heterogéneamente expresados, que de los canales  $K_{ir6.2}/SUR2A$ . La droga estimuló de manera efectiva la secreción de insulina de las islas pancreáticas y disminuyó el nivel de glucosa en sangre *in vivo*. Estos resultados parecen indicar que el HMR1098 no es un inhibidor específico cardiaco de los canales  $K_{ATP}$ .<sup>146</sup> Por tanto, en ausencia de mejores opciones para un bloqueo específico de los canales  $K_{ATP}$  del sarcolema cardiaco, se podría utilizar HMR 1402. De hecho, esta droga redujo significativamente la incidencia de FV protegiendo 7 de 8 perros con infarto sin alterar los niveles de insulina en plasma, los niveles de glucosa en sangre,

o los incrementos el flujo coronario medio inducido por ejercicio o por oclusiones coronarias de 15 s. Así, el antagonista de los canales  $K_{ATP}$  HMR 1402 podría evitar la FV sin alterar el flujo sanguíneo coronario o los niveles de glucosa en sangre *in vivo*.<sup>147</sup> Sin embargo, en experimentos en los que la especificidad cardíaca no sea imprescindible, la glibenclamida (fácilmente accesible y extremadamente más barata que el HMR 1098 o el HMR 1402) parece continuar como la aproximación más práctica para bloquear los canales  $K_{ATP}$  en preparaciones *ex vivo*.

#### **6.2.4 Papel del sistema de Purkinje vs. gradientes de $I_{KATP}$ en la FV de larga duración durante isquemia global. Interacción de la apertura de los canales $K_{ATP}$ , hiperpotasemia y bajo pH.**

Algunos estudios realizados por el grupo de Ideker han puesto de relieve el papel potencial de las fibras de Purkinje al mantenimiento de la FV de larga duración bajo isquemia global mediante descargas focales en corazones caninos<sup>148-151</sup> y porcinos<sup>72</sup>, en parte debido a su mayor resistencia a la isquemia. Algunos de estos estudios revelaron grandes gradientes en la tasa de activación de la FV entre endocardio y epicardio de ventrículo izquierdo en el perro, pero no en el cerdo. Estas diferencias se justifican por la diferente organización de las fibras de Purkinje en estas especies (exclusivamente endocárdica en el perro vs. transmural en el corazón porcino).<sup>152</sup>

Por el contrario, en otro estudio, los complejos gradientes en la tasa de activación de la FV de larga duración en corazones caninos estructuralmente normales (grandes heterogeneidades tanto entre los ventrículos como a nivel local dentro de cada ventrículo) no podían explicarse únicamente por la distribución de las fibras de Purkinje y estaban relacionados con las diferencias regionales en la depresión eléctrica secundaria a la isquemia global de larga duración. De hecho, las magnitudes de los gradientes inter e intra-ventriculares en la tasa de activación de la FV eran comparables a la magnitud del gradiente transmural, con localizaciones epicárdicas en la inserción del ventrículo derecho que se activaban tan rápido como el endocardio del ventrículo derecho.<sup>152</sup> En consonancia con lo anterior, la heterogeneidad transmural de  $I_{KATP}$ , y no la distribución del sistema de Purkinje, fue determinante en el gradiente observado en la tasa de activación durante la FV inicial en un modelo informático detallado de ventrículo de conejo.<sup>153</sup> De hecho, el uso simulado de glibenclamida (bloqueador de  $K_{ATP}$ ) produjo la terminación espontánea de la FV en pocos segundos,<sup>153</sup> lo cual es congruente con resultados previos en corazones humanos enfermos.<sup>82</sup> El sistema de Purkinje no desempeñó ningún papel en los gradientes transmurales, pero aumentó la complejidad de las reentradas cerca de los terminales de Purkinje.<sup>153</sup> Además, las diferencias interventriculares en  $I_{KATP}$  parecen ser las responsables del gradiente de repolarización epicárdico durante isquemia global que se ha visto en corazones de cobaya.<sup>154</sup> Todos estos hallazgos apuntan a la distribución heterogénea de los canales  $K_{ATP}$  como el principal responsable de los gradientes en las tasas de activación de la FV durante isquemia global. Por lo tanto, centrarse en el papel de los canales  $K_{ATP}$  podría

resultar más eficaz que una orientación centrada en el papel del Purkinje de cara a terminar la FV.<sup>155</sup>

Es importante recordar que la FV en el corazón bajo isquemia global se caracteriza por una depresión eléctrica progresiva que se manifiesta como una disminución en la tasa de activación de la FV y en la pérdida de la excitabilidad. Las heterogeneidades eléctricas pueden afectar los resultados de la desfibrilación y la reanimación durante la parada cardiaca.<sup>156</sup> El grupo de Zaitsev ha encontrado que la apertura de  $I_{KATP}$  en corazones caninos durante FV en isquemia global tuvo un papel limitado en la desaceleración de la tasa de la FV y su gradiente transmural, pero fue un factor importante en la aparición de inexcitabilidad local y global.<sup>157</sup> De hecho, tras 10 minutos de isquemia global, la glibenclamida disminuyó el porcentaje de área inexcitable, y no se produjo asistolia en ningún corazón (en contraste con una incidencia de asistolia del 56% en los corazones sin tratar).<sup>157</sup> El mismo grupo ha publicado recientemente otro trabajo estudiando si la combinación de la hiperpotasemia y la activación de los canales  $K_{ATP}$  determina el gradiente en la tasa de activación y la depresión eléctrica en el corazón canino en FV durante isquemia global.<sup>156</sup> Ese estudio concluyó que la hiperpotasemia y/o la activación de los  $K_{ATP}$  no pueden explicar adecuadamente la depresión eléctrica heterogénea y la depresión eléctrica durante la FV en isquemia global.<sup>156</sup> En cuanto al papel de la hiperpotasemia en FV perfundida no isquémica, en un estudio con corazones de cerdo, 2 de 5 episodios de FV terminaron con un nivel de 12 mM de  $K^+$  extracelular.<sup>158</sup>

Un estudio reciente realizado por el grupo de Ideker en un modelo canino *in vivo* de FV de larga duración encontró 2 patrones de activación organizada diferentes en el endocardio del ventrículo izquierdo a medida que avanzaba la FV.<sup>159</sup> Entre los 3 y los 7 minutos de FV, un período de tiempo durante el cual muchos pacientes con FV reciben la terapia inicial, estos 2 patrones organizados estuvieron presentes el 96% del tiempo. Un patrón de activación fue consistente con un circuito macroreentrante dominante, o bien un rotor madre estable alrededor del ápex del ventrículo izquierdo. El otro fue consistente con actividad desencadenada, posiblemente originada en el sistema de Purkinje o por circuitos reentrantes intramurales.<sup>159</sup> Sin embargo, la resolución del catéter-*basket* de 64 electrodos utilizado, con distancia entre electrodos de 4 mm, no permitió el análisis cuantitativo de los frentes de onda y limitó la detección de circuitos de reentrada pequeños. Son resultados ciertamente muy interesantes, pero hay que tener en cuenta que estos resultados podrían haber sido fuertemente influenciados por la especie animal utilizada (perro).

El mismo grupo ha investigado recientemente la importancia de la activación del Purkinje durante la FV de larga duración en perros y cerdos.<sup>160</sup> Vieron que durante la FV, las activaciones del Purkinje se registraron principalmente en el endocardio en perros, pero estaban dispersas transmuralmente en los cerdos. Además, las localizaciones de registro con complejos de activación de Purkinje tenían tasas de activación significativamente más rápidas que las

localizaciones sin complejos de activación de Purkinje. Los autores reconocen en su sección de limitaciones que aunque las células de Purkinje se activan más rápido que las células del miocardio, no habría pruebas directas para demostrar que las células de Purkinje dirijan la activación del miocardio adyacente durante la FV de larga duración. Sin embargo, sugieren que sus hallazgos son consistentes con esta hipótesis.<sup>160</sup>

Así que parece que todavía hay mucho por hacer. La investigación sobre estos temas en corazones humanos parece que podría ser crucial para una mejor comprensión de la FV de larga duración en humanos bajo condiciones de isquemia global, que es el tipo más relevante de FV para aplicar los hallazgos al mundo real. Esta comprensión mejorada podría traer tratamientos farmacológicos eficaces para prevenir la FV, o por lo menos, una mejora en los resultados de la desfibrilación y la reanimación.

### 6.2.5 Papel del $\text{Ca}^{2+}$ en el mantenimiento de la FV

En condiciones normales, los potenciales transmembrana ( $V_m$ ) y los transitorios de calcio intracelular ( $\text{Ca}_i\text{T}$ ) están acoplados bidireccionalmente en el corazón, de tal forma que las corrientes iónicas de membrana regulan los ciclos de  $\text{Ca}_i\text{T}$  y, a su vez, los  $\text{Ca}_i\text{T}$  afectan a las corrientes iónicas que regulan la duración potencial de acción.<sup>161</sup> Aunque los  $\text{Ca}_i\text{T}$  siguen a  $V_m$  de manera consistente en el corazón a tasas de activación normales, no puede decirse lo mismo a tasas muy rápidas.<sup>161</sup> Algunos autores sugirieron que durante la FV pueden ocurrir eventos de liberación de calcio intracelular no dependientes de voltaje y pueden influenciar la ocurrencia de rotura de frentes mediante la alteración del  $V_m$  y la duración del potencial de acción a nivel local. Warren et al. realizaron CO dual de  $V_m$ - $\text{Ca}_i\text{T}$  en corazones de cerdo perfundidos con sangre.<sup>39</sup> Sus resultados no apoyan presencia de  $\text{Ca}_i\text{T}$  espontáneos, no desencadenados por  $V_m$ , y sugirieron que la disociación  $V_m/\text{Ca}_i\text{T}$  es una consecuencia más que una causa de la rotura de frentes.<sup>39</sup> Estos resultados fueron cuestionados argumentando problemas metodológicos,<sup>162</sup> pero Warren et al. confirmaron sus resultados tras realizar nuevos experimentos.<sup>163</sup>

Otro estudio puso de relieve de papel de la dinámica del calcio intracelular en el núcleo de rotores estacionarios en corazones de conejo perfundidos Langendorff durante taquicardia ventricular monomórfica, ya que un quelante del calcio evitó la formación del rotor.<sup>164</sup> Recientemente, Kong et al. ha realizado CO dual intramural de  $V_m$  y  $\text{Ca}_i\text{T}$  durante FV de larga duración en corazones caninos.<sup>165</sup> Encontraron una desincronización progresiva entre  $V_m$  y  $\text{Ca}_i\text{T}$  ya que no todo potencial de acción era seguido por un  $\text{Ca}_i\text{T}$ , pero sí que todos los  $\text{Ca}_i\text{T}$  eran precedidos por un  $V_m$ , lo que concuerda con los resultados de Warren et al.<sup>39</sup> El hecho de que  $V_m$  siempre precediera a los  $\text{Ca}_i\text{T}$  indica que las oscilaciones espontáneas del calcio intracelular en el miocardio no son una causa probable del mantenimiento de la FV de la larga duración. En contraste, en un estudio con cerdos a tórax abierto, el verapamilo aumentó la velocidad de conducción alrededor del núcleo central de las reentradas, redujo el ciclo de la reentrada y disminuyó su incidencia en un 70% en los primeros 20 s de FV.<sup>166</sup> Tras 200 s de FV, el

verapamilo disminuyó la tasa de activación y la velocidad de conducción en comparación con sus datos control previos.<sup>167</sup> Estos resultados sugerirían que los canales de calcio tipo L permanecen activos y pueden ser importantes en el mantenimiento de la FV de larga duración.<sup>167</sup>

Es importante destacar que un estudio reciente en corazones de conejo Langendorff perfundidos demostró que el retículo sarcoplásmico está prácticamente refractario durante la FV, a pesar de un aumento diastólico en el calcio libre dentro del retículo sarcoplásmico y del calcio intracelular.<sup>168</sup> Este hecho sugiere que los  $\text{Ca}_i\text{T}$  observados durante la FV se componen principalmente de corrientes de calcio trans-sarcolema, es decir, a través de canales de calcio tipo L y del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . También encontraron que tras la terminación espontánea de la FV, el calcio libre dentro del retículo sarcoplásmico es  $\approx 30\%$  mayor que durante el ritmo sinusal normal, lo que podría aumentar la probabilidad de liberación espontánea de calcio desde el retículo sarcoplásmico en el período inmediatamente posterior a la FV, originando un período particularmente vulnerable.<sup>168</sup>

De hecho, se ha propuesto una disfunción en la manipulación del calcio intracelular y una sobrecarga de calcio durante la FV como causa del entumecimiento miocárdico post-desfibrilación y el desencadenamiento de re-fibrilación mediante i) la activación de mecanismos compensatorios tales como el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y ii) la generación de postpotenciales. Las desfibrilaciones fallidas y las re-fibrilaciones conducen a más de isquemia, y por tanto a un empeoramiento de la sobrecarga de calcio. La estabilización del ciclo de calcio cardíaco podría ser capaz de mitigar este círculo vicioso, mejorar la desfibrilación, y por lo tanto mejorar la supervivencia tras la FV.<sup>169</sup> En este sentido, en un estudio reciente realizado por el grupo de Nanthakumar, se utilizó el dantroleno, que es un estabilizador del receptor-1 de la rianodina del músculo esquelético que se utiliza para tratar la hipertermia maligna.<sup>169</sup> Demostraron que la infusión de dantroleno durante la FV facilita la desfibrilación exitosa, mejora la hemodinámica post-desfibrilación y disminuye la tasa de re-fibrilación. El dantroleno mejoró la supervivencia, sin promover arritmias en este modelo porcino *in-vivo* de parada cardíaca y reanimación cardiopulmonar.<sup>169</sup> Estos efectos fueron mediados por una moderación del aumento de la desorganización dependiente del tiempo en la FV y por la normalización de la desregulación del calcio inducida por la FV. De hecho, el dantroleno mejoró la organización espacio-temporal de las ondas de calcio durante la FV en corazones de conejo *ex vivo*. Además, a nivel de Purkinje, el dantroleno impidió las arritmogénicas fugas de calcio durante la diástole y suprimió la actividad desencadenada.<sup>169</sup>

Teniendo en cuenta toda esta información, la importancia del calcio en la FV es un tema muy controvertido. Por ello, la confirmación de su papel, mediante un análisis espacio-temporal detallado de su dinámica en un modelo de corazón humano *ex vivo* podría tener un gran interés.

### 6.2.6 Fases de la FV en presencia de isquemia global. Estudios en corazón humano

Varios estudios han mostrado la existencia de múltiples fases en modelos animales de FV bajo isquemia global, siendo 3 o 4 fases en los cerdos,<sup>108, 111</sup> y 5 en los perros.<sup>170</sup> En el estudio de Huizar et al.<sup>171</sup> se encontraron tres fases distintas: relativamente periódica, muy periódica y aperiódica. En los dos primeros de ellos, los rotores podrían tener un papel importante. De hecho, la presencia de los rotores ha sido confirmada durante la FV en corazón humano,<sup>47, 113-119</sup> aunque eran mayoritariamente corazones enfermos. La FV humana se ha estudiado *ex vivo*,<sup>115, 116</sup> pero también *in vivo* durante cirugía cardíaca.<sup>47, 113, 114, 117</sup> Algunas de estos estudios sugieren la coexistencia de varios mecanismos manteniendo la FV.<sup>77</sup>

Sin embargo, aunque se han realizado estudios de CO de la activación transmural y refractariedad durante ritmos estimulados en cuñas de corazón humano "normales" y enfermos,<sup>102, 103, 172</sup> y se han cartografiado ópticamente corazones enfermos durante FV perfundida como prueba de concepto,<sup>76</sup> se carece de datos detallados de la FV humana obtenidos con alta resolución espacio-temporal durante isquemia global de larga duración, en especial en corazones "normales". La descripción de las diferentes fases de la FV en el corazón humano durante isquemia global con tal nivel de detalle espacio-temporal sería de gran interés, y podría aclarar de una vez por todas, la contribución de los diferentes potenciales mecanismos subyacentes al mantenimiento de la FV, siempre y cuando la metodología utilizada fuera la adecuada.

### 6.2.7 ¿Rotores dirigiendo la FV en pacientes?

En el trabajo presentado en el **Capítulo 4** de esta Tesis se demostró la viabilidad de una FV mantenida a largo plazo por rotores de muy alta frecuencia relativamente estables. Sin embargo, se trataba de una situación creada artificialmente mediante la apertura de los canales  $K_{ATP}$  con cromakalima. Precisamente, la apertura de los canales  $K_{ATP}$  era la que favorecía una estabilidad aumentada de rotores visibles epicárdicamente. Por ello, es razonable pensar que los rotores también puedan desempeñar un papel importante en la FV en humanos en una situación realista, en la que la presencia de isquemia desemboca en la apertura de los canales  $K_{ATP}$ . Sin embargo, no hay que olvidar que durante una FV real en un paciente, hay presentes otros muchos factores además de este.

Recientemente el grupo de Narayan ha estudiado en 26 pacientes las diferencias entre episodios de FV inducidos autolimitados y aquellos que requerían desfibrilación.<sup>173</sup> Se introdujo un catéter *basket* en cada ventrículo y realizaron un total de 52 intentos de inducción de FV, consiguiendo 36 episodios en 19 pacientes. Utilizando el sistema FIRM y el cartografiado de fases descrito en el **Capítulo 5**, se analizaron los primeros 10 segundos de FV (tras lo que se aplicaba un choque de desfibrilación), o el intervalo disponible hasta que el episodio autoterminase (siempre y cuando sucediese en los primeros 10 segundos). Su sistema detectó

rotores en 16 de los 19 pacientes en los que se indujo FV. En todos en los episodios en los que la FV no autoterminaba había rotores implicados, que además eran más estables:  $17 \pm 11$  rotaciones (rango 7-48) en las FV que requirieron desfibrilación versus  $1.1 \pm 1.4$  rotaciones (rango 0-4) en las autolimitadas. Además, en los 7 pacientes en los que se indujo más de 1 episodio, las localizaciones de los rotores en las FV no autolimitadas eran reproducibles. Por ello, los autores concluyen que la formación de rotores estables identifica a los pacientes en los que la FV requiere desfibrilación, frente a aquellos en los que la FV es autolimitada.

Este mismo grupo, en un trabajo aparecido un año después, comprobó si la ablación de las localizaciones de estos rotores, modificaba la inducibilidad de FV en 9 perros y en 1 paciente con cardiopatía estructural y descargas repetitivas de su desfibrilador implantable debido a FV refractaria a fármacos antiarrítmicos. En 6 de los perros, la ablación en las localizaciones de los rotores hizo que la FV no fuera reinducible, y en los 3 restantes aumentó el umbral de inducción. En el paciente, se identificaron 4 rotores localizados en tejido heterogéneo y se ablacionaron, haciendo la FV no inducible. El paciente pasó de 7 descargas de su desfibrilador en 8 meses antes de la ablación, a no requerir ninguna en el año siguiente, sin fármacos antiarrítmicos. Una crítica fácilmente realizable a este último trabajo es que los tiempos de ablación en las localizaciones de rotores ( $8 \pm 2$  minutos en los perros, y  $6.3 \pm 1.5$  minutos/rotor en el paciente) hacen pensar que las ablaciones no fueron tan “localizadas” como uno podría esperar.

A pesar de todo, estos hallazgos apoyan claramente el papel de los rotores en el mantenimiento de la FV. No obstante, no hay que olvidar que los datos proporcionados por el sistema de cartografiado FIRM son muy controvertidos.<sup>174-181</sup> Este tema, aún muy candente, será abordado con más profundidad en el siguiente apartado.

### **6.3 Suplemento a la discusión acerca de las nuevas técnicas de bases mecanicistas para la ablación de la FA**

#### **6.3.1 Controversia reciente sobre el sistema FIRM para cartografiado y ablación de la FA**

En los últimos 3 años se han publicado una serie de artículos de Narayan et al.<sup>91-97</sup> y otros,<sup>182</sup> en los que se informa de los resultados de un nuevo sistema de cartografiado y ablación con bases mecanicistas (FIRM, *focal impulse and rotor modulation*). Si los resultados mostrados son ciertos, y en principio uno debería pensar que sí, dicha herramienta ha demostrado una aplicación práctica sustancial en el laboratorio de electrofisiología clínica, asistiendo en la cartografía y la ablación de rotores y focos localmente estables durante la FA. Estos datos de Narayan et al., son quizá uno de los primeros ejemplos de una traducción eficaz de datos derivados de experimentos y simulaciones por ordenador sobre los mecanismos de una arritmia compleja, hacia el diagnóstico y la terapia de ablación, como lo demuestra el resultado de su

ensayo clínico CONFIRM.<sup>94</sup> Recientemente, se han publicado los resultados del seguimiento extendido durante 3 años.<sup>97</sup> El grupo de ablación guiado por FIRM mantuvo tasas significativamente más bajas de recurrencia de FA que la terapia convencional. Así, tras un solo procedimiento, el 78% de los pacientes en el grupo guiado por FIRM se mantuvo libre de FA vs. un 36% en el grupo al que sólo se le realizó ablación de venas pulmonares.<sup>97</sup> Además, los resultados de un estudio multicéntrico parecen confirmar estos datos.<sup>182</sup> La empresa responsable del desarrollo del sistema FIRM (Topera Inc.) ha sido comprada recientemente (Octubre de 2014) por Abbott, que ha pagado más de 250 millones de dólares por la misma.

Como se expuso en el **Capítulo 5** de esta Tesis, hay que tener en cuenta que el protocolo de ablación FIRM incluyó no sólo la ablación de focos y rotores, sino también aislamiento de venas pulmonares y otros procedimientos estándar en FA no paroxística.<sup>94</sup> Además, el sistema de cartografiado FIRM tiene una serie de limitaciones que se han enumerado claramente en el **Capítulo 5**. Estas limitaciones, y en especial la referente a que el algoritmo utilizado por el sistema de cartografiado no se ha revelado y sólo conocemos unas pequeñas pinceladas del mismo, han hecho que algunos líderes de opinión tengan serias dudas sobre los datos publicados y la utilidad real del sistema FIRM.

En este contexto, puede ser interesante comentar los resultados de un estudio publicado hace muy poco (Junio de 2015) en *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* por Benharash et al.<sup>177</sup> que podría crear serias dudas sobre la utilidad del sistema FIRM. Curiosamente, uno de los autores *senior* de dicho estudio es K. Shivkumar, que a su vez es coautor de varios artículos previos en los que se informa de resultados extremadamente positivos del sistema FIRM,<sup>91, 94, 96, 97, 182</sup> siendo incluso primer autor de uno de ellos.<sup>183</sup> Otro de los autores *senior* de dicho estudio es R. Mandapati, que trabajó en el laboratorio de Jalife durante varios años, durante los que fue coautor de varios estudios que mostraban un papel relevante de los rotores en modelos experimentales de FA.<sup>18, 184-186</sup>

El estudio realizado por Benharash et al.<sup>177</sup> tenía como objetivo el probar el procedimiento FIRM cuantificando las propiedades espectrales y de regularidad de los electrogramas auriculares registrados en las localizaciones de los supuestos rotores detectados durante el cartografiado y ablación de la FA. Los autores incluyeron un análisis retrospectivo de 24 pacientes consecutivos sometidos a ablación de FA, con un porcentaje significativo de pacientes que tenían una historia previa de múltiples procedimientos de ablación fallidos. Utilizaron el sistema de Topera para determinar la localización de potenciales rotores y focos estables. Estas localizaciones fueron ablacionadas con el objetivo de terminar la FA, o al menos hacerla más lenta y más organizada. El análisis incluye además mapas de activación con señales unipolares del catéter-*basket*, entropía de Shannon y frecuencia dominante.<sup>177</sup> En dicho trabajo, ni el análisis de frecuencias dominantes, ni el de entropía de Shannon, mostraron diferencias entre las localizaciones que albergaban rotores y las que no. Además, la tasa de terminación de la FA ablacionando las fuentes detectadas por el sistema FIRM fue



extremadamente baja: sólo 1 de los 24 pacientes. Adicionalmente, en 3 de los 24 pacientes la FA se organizó tras la ablación, aunque no terminó.<sup>177</sup> El artículo mostró que las señales unipolares auriculares eran de mala calidad en todos los casos y sólo un promedio de 20 de las 64 señales proporcionadas por el catéter-*basket* eran adecuadas para el análisis. Además, un área sustancial de la aurícula izquierda no se consideró para el análisis debido a la incapacidad del catéter para cubrir toda su superficie endocárdica, a pesar de lo cual el sistema computacional FIRM detectaba rotores de manera habitual.

Los resultados fueron tan extraordinariamente pobres y tan diferentes de los mostrados previamente por Narayan et al.<sup>91-97</sup> que en el artículo provocó un editorial que mostraba la necesidad de más estudios para comprender mejor los mecanismos de la FA persistente.<sup>178</sup> La opinión de Jalife et al.<sup>180</sup> en una reciente carta al Editor referente al citado artículo, es que un examen detallado de los datos presentados por Benharash et al. revela que cometieron una serie inquietante de errores que probablemente contribuyó a la obtención de unos resultados tan negativos. Según Jalife et al.,<sup>180</sup> un análisis riguroso y detallado de los resultados plantea dudas importantes acerca de la validez científica y la integridad del estudio.<sup>180</sup> El listado exhaustivo de problemas encontrados por Jalife et al. puede consultarse en la propia carta al Editor.<sup>180</sup> En esa carta, los autores concluyen que aunque un cierto escepticismo acerca del sistema de cartografía y ablación FIRM es saludable y necesario, y aunque con la evidencia disponible, la contribución relativa de los rotores estables o transitorios al mecanismo de la FA persistente en humanos sigue siendo incierta y requiere más investigación, el trabajo de Benharash et al. no tiene el material o la calidad científica para contrarrestar los resultados positivos mostrados en estudios previos por Narayan et al.<sup>91-97</sup> y otros.<sup>182</sup>

En la carta de respuesta,<sup>179</sup> los autores asumen las limitaciones de las técnicas de análisis que utilizaron, pero se reafirman en la validez de sus datos. Además, aportan varias referencias a comunicaciones en congresos recientes (*Heart Rhythm* y *Europace* 2015) de grupos que usando el sistema comercial FIRM han obtenido tasas de éxito agudas de entre el 0% y el 11%, en línea con los resultados que ellos presentaron. Además alegan que los 24 casos se hicieron en presencia de representantes de la empresa Topera, e incluso 11 de ellos en presencia de su fundador (en supuesta referencia a Narayan), lo que iría en contra del argumento de que los pobres resultados obtenidos se deberían a una utilización incorrecta o no completamente adecuada del sistema. Sus resultados vienen a decir que los electrogramas de las zonas que el sistema detectaba como rotores no tenían ninguna característica distintiva que hiciera pensar que realmente correspondían a rotores reales, lo que se podría resumir como que el sistema de cartografiado FIRM se “inventa” los rotores mediante algoritmos de interpolación propietarios a partir de electrogramas de baja calidad debidos a un contacto pobre del catéter *basket* con el endocardio auricular.<sup>179</sup> De hecho, prácticamente a la vez que se publicó esta carta en *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, aceptaron a este mismo grupo otro artículo en *Heart Rhythm* describiendo sus resultados y los de otro centro a largo plazo en 43 pacientes

(56% paroxísticos, 44% persistentes).<sup>181</sup> La FA sólo terminó de manera aguda en el 9% de los pacientes y se organizó en el 16%. En la mayoría de los pacientes se realizó aislamiento de venas pulmonares tras la ablación guiada por FIRM, pero no se realizó ablación de sustrato adicional, lo cual es una diferencia respecto a los procedimientos de Narayan.<sup>96, 97, 99</sup> La tasa de complicaciones fue muy elevada, del 9%. Durante un seguimiento de 18 meses, la FA recurrió en el 63% de los pacientes. Estos resultados están muy lejos de los descritos por Narayan et al.<sup>94, 95,</sup>  
97

En conjunto,<sup>177, 181</sup> los resultados de este grupo vienen a decir que los electrogramas de las zonas que el sistema detectaba como rotores no tenían ninguna característica distintiva que hiciera pensar que realmente correspondían a rotores reales, lo que se podría resumir como que el sistema de cartografiado FIRM se “inventa” los rotores mediante algoritmos de interpolación propietarios a partir de electrogramas de baja calidad debidos a un contacto pobre del catéter *basket* con el endocardio auricular.<sup>179</sup> Según ellos, eso no quieren decir que los rotores no tengan un papel importante en el mantenimiento de la FA, pero muestran sus dudas acerca de que la ablación de rotores sea efectiva, pues según ellos, convertiría una reentrada funcional, en una anatómica alrededor de la lesión producida.<sup>179</sup> En este sentido, el grupo de Narayan ha publicado recientemente un artículo en el que mediante simulaciones por ordenador en 2D, examinan los mecanismos por los que la ablación cerca del núcleo de un rotor terminaría la FA en vez de anclar la reentrada alrededor de un obstáculo anatómico.<sup>187</sup> Sus modelos mostraron lo siguiente: i) la ablación efectivamente puede anclar la reentrada, lo que organizaría la FA dando lugar a taquicardias organizadas; ii) la ablación de rotores en regiones de baja excitabilidad debido al remodelado auricular, producirían reentrada en tejido más excitable, lo que desembocaría en colisión de ondas y vuelta a ritmo sinusal; iii) la ablación de rotores en regiones de alta excitabilidad haría que los rotores migraran a regiones menos excitables, donde perderían anclaje y colisionarían con bordes no excitables volviendo a ritmo sinusal; iv) la ablación puede conectar zonas de rotores a regiones anatómicas no conductoras lo que bloquearía la propagación de los frentes fibrilatorios; y v) la reentrada a través de canales de conducción lenta puede hacer que la FA termine si los canales se cierran completamente mediante ablación.<sup>187</sup> Aunque estos mecanismos de terminación son perfectamente plausibles, no hay que olvidar las limitaciones inherentes a las simulaciones por ordenador, especialmente si se trata de modelos 2D como en este caso, que no tienen en cuenta la conducción tridimensional en el tejido.

En vista de los resultados completamente enfrentados entre los grupos de Narayan<sup>91-97</sup> y Shivkumar<sup>183, 192</sup> (que como se ha dicho, curiosamente es coautor<sup>91, 94, 96, 97, 182</sup> e incluso primer autor<sup>183</sup> de alguno de los primeros artículos que mostraban la alta eficacia del sistema FIRM), parece cada vez más evidente que será necesario un ensayo clínico multicéntrico, controlado y aleatorizado para demostrar si el sistema FIRM es realmente útil o no lo es.

### 6.3.2 Mecanismos propuestos para mantener la FA persistente y de larga duración. ¿Son los rotores causa o consecuencia de la fibrilación?

Por todo lo dicho anteriormente, el papel de los rotores en la FA humana es extremadamente controvertido. Resultados como los de de Groot/Allessie et al.,<sup>188, 189</sup> Lee et al. (grupo de Kalman),<sup>190</sup> o Lee et al. (grupo de Waldo)<sup>191</sup> que muestran una baja o nula incidencia de rotores en registros obtenidos mediante cartografiado eléctrico epicárdico (placa multielectrodo) de regiones de las aurículas (más pequeñas o más grandes dependiendo del estudio) durante cirugías cardíacas en pacientes, hacen pensar que los rotores no tendrían un papel relevante en el mantenimiento de la FA. Sin embargo, estos estudios tampoco se ponen de acuerdo en los mecanismos subyacentes.

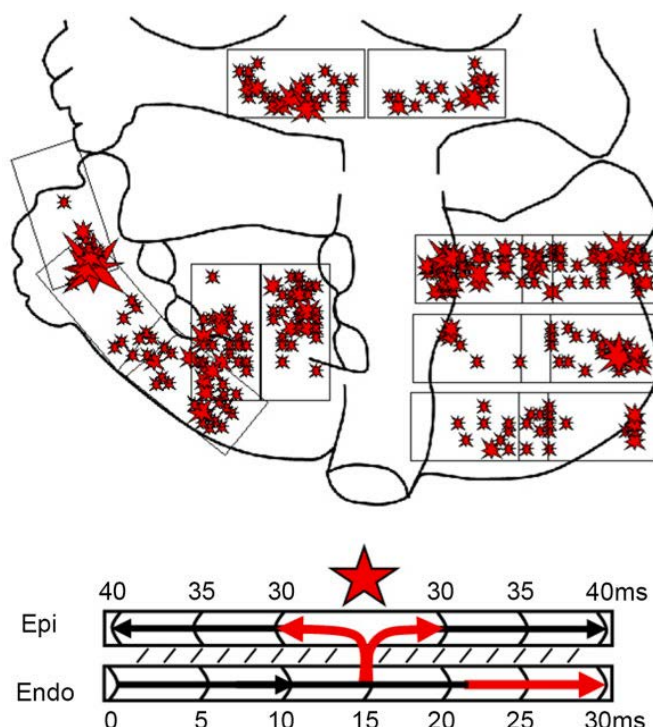
El grupo de Jalife ha publicado numerosos artículos en los últimos 20 años en los que se defiende un papel relevante de los rotores y la reentrada en la fibrilación cardíaca en modelos animales.<sup>18, 22, 30, 59, 131-133, 184-186, 192-196</sup> Nosotros hemos puesto nuestro modesto granito de arena con el trabajo presentado en el **Capítulo 4**.<sup>26</sup> En pacientes, los resultados de un estudio publicado por Atienza et al.<sup>197</sup> en *Circulation* sugirieron que la FA está mantenida mediante fuentes reentrantes. Para comprobar esta hipótesis, se infundió adenosina a 33 pacientes con FA (21 paroxística, 12 persistente) tras lo que la activación se aceleró en las regiones ya de por sí más rápidas basalmente (fundamentalmente unión de las venas pulmonares con la aurícula izquierda en las FAs paroxísticas y otras localizaciones extra pulmonares en las persistentes). La interpretación de los resultados hacia un papel preponderante de la reentrada, se basó en el hecho de que la adenosina incrementa la conductancia de los canales rectificadores de potasio, acortando el potencial de acción y disminuyendo la excitabilidad (lo que favorece la reentrada), mientras que reduce los automatismos.<sup>197</sup>

A pesar de esto, y casi 10 años más tarde, aún no hay consenso acerca de la naturaleza reentrante de los directores de la FA, o ni siquiera de si los hay en la FA persistente o de larga duración. A continuación, sin pretender ser exhaustivo, se muestran las posturas de algunos investigadores o grupos de gran relevancia en los últimos años en el estudio de los mecanismos de la FA que no pudieron ser excesivamente discutidas en el trabajo presentado en el **Capítulo 5**, bien por limitación de palabras, bien porque se refieren a trabajos aún no publicados en el momento de escritura de dicho trabajo.

#### La postura de Allessie y de Groot

Allessie y de Groot observaron un origen focal de las ondas en fibrilación, pero estas ondas no fueron reproducibles ni en el tiempo ni el espacio, lo que sugeriría que no existen elementos dirigiendo la FA. Su análisis sugirió que estos “focos” no sostenidos ni reproducibles eran debidos a afloramientos epicárdicos de ondas provenientes del endocardio. Ellos explican el mantenimiento de la FA sin elementos directores mediante su “hipótesis de la doble capa”,<sup>193, 194</sup> que se muestra esquemáticamente en la **Figura 30**. Debido a una hipotética disociación endo-

epicárdica consecuencia del remodelado auricular, cada vez que una onda fibrilatoria muriese en una capa (endocardio o epicardio), crearía una oportunidad de que alguna de las múltiples ondas en la otra capa condujera transmuralmente y reemplazara a la onda extinta, apareciendo como un afloramiento. Esta asunción se basa en que los electrogramas unipolares en la localización de activación más temprana mostraban onda R, lo que sugería que eran causadas por un afloramiento que venía desde el endocardio.



**Figura 30.** Afloramientos epicárdicos (supuestamente provenientes del endocardio) registrados con placa multielectrodo en un paciente en el que se indujo FA de manera aguda. Se utilizó una placa rectangular flexible de 8x16 electrodos, que se posicionó de manera consecutiva en diferentes partes de las aurículas, registrando 10 s en cada región. Se observaron afloramientos (marcados con estrellas, más grandes cuanto mayor es la tasa de afloramientos por segundo en dicha localización) en múltiples localizaciones de la superficie epicárdica de ambas aurículas. El diagrama de abajo muestra un esquema de cómo un afloramiento endo-epicárdico puede servir como fuente de “nuevas” ondas en el contexto de la FA.<sup>175, 189</sup>

Los propios Allesie y de Groot, en un editorial al artículo de Lee et al. (grupo de Kalman)<sup>190</sup> titulado “*Rotors during atrial fibrillation: drivers or bystanders?*” ponen en duda el papel de los rotores como directores de la FA.<sup>176</sup> Una reflexión interesante que ofrecen en dicho editorial es la siguiente:

*Será que la alta complejidad de la FA no se ve con las técnicas de mapeo de baja densidad (en referencia a los catéteres basket o la imagen electroanatómica) y los algoritmos de*

*sus sistemas se “inventan” los rotores en caso de carencia de datos? O será que el cartografiado de alta densidad (en referencia a las placas multielectrodo) no ve los rotores porque no mira todos los sitios y se centra demasiado en los detalles locales? [...] En otras palabras, mientras que los sistemas de “baja densidad” cuentan mayoritariamente con nuestro instinto de “si lo veo me lo creo”, el cartografiado de “alta densidad” podría hacer que “los árboles no nos dejaran ver el bosque”.*<sup>176</sup>

Es por esto que Allesie y de Groot, sin negar del todo la posibilidad de que los rotores tuvieran un papel importante en el mantenimiento de la FA persistente, creen que en este momento, y debido a las limitaciones de los sistemas de registro, aún no es posible contestar a la pregunta de si los rotores dirigen la fibrilación, o simplemente “pasaban por allí”. En otras palabras, si son causa o consecuencia de la fibrilación.

Esta diferencia de criterios provocó una interesante serie de artículos con puntos de vista opuestos entre Jalife + Narayan vs Allesie + de Groot en *The Journal of Physiology*.<sup>174, 175, 198, 199</sup> Este doctorando recomienda encarecidamente su lectura.

A modo de resumen, Narayan y Jalife consideran demostrado que los rotores dirigen la FA en humanos basándose fundamentalmente en los artículos de Narayan, donde la ablación de focos y rotores localizados termina la FA de manera aguda en muchos pacientes, y mantiene a un porcentaje alto de los mismos sin recurrencias a largo plazo. Consideran que los experimentos realizados con placas multielectrodo y que son incapaces de ver rotores o los ven sólo esporádicamente, tienen importantes limitaciones técnicas, solo cartografían pequeñas áreas de la aurícula que perfectamente podrían ser actividad fibrilatoria fuera de las zonas de alta frecuencia (rotores o focos) que dirigirían la fibrilación y, además, incluyen un número muy limitado de pacientes. Además, consideran que la hipótesis de la doble capa carece de prueba de causalidad, es decir, no se realizó ninguna intervención que demostrara que efectivamente los afloramientos endo-epicárdicos, supuestamente consecuencia de una disociación en 2 capas de la aurícula, fueran realmente la causa de mantenimiento de la FA persistente. En contra de esta hipótesis, también está el hecho de que la ablación localizada de las regiones de lo que serían focos o rotores según el sistema FIRM (y posteriormente también con el sistema de imagen electrocardiográfica utilizado por Haïssaguerre et al.<sup>89</sup>), sí termina la FA de manera aguda en la mayoría de los pacientes (prueba de causalidad).<sup>198, 199</sup>

Por su parte, Allesie y de Groot consideran que no está claro que la FA en humanos esté dirigida por rotores, y que los rotores estables que ve el sistema FIRM de Narayan, necesitarían ser validados mediante técnicas de cartografiado de alta resolución. Consideran además que el estudio CONFIRM<sup>94</sup> es un estudio observacional no diseñado para probar la eficacia clínica de la ablación de fuentes localizadas, ya que no es randomizado, no tiene criterios de inclusión o exclusión, son datos de un solo centro y 33 pacientes tenían ablación

previa. Hacen varias críticas (algunas de ellas muy justificadas) al sistema de cartografiado utilizado en dicho estudio, incluso dando a entender que el sistema se “inventa” los rotores, y muestran la necesidad de una validación independiente. También reconocen que su propia hipótesis de la doble capa requiere validación adicional mediante cartografiado simultáneo endo-epicárdico en pacientes, pero que el defender que la FA se basa en fuentes de alta frecuencia localizadas, crea falsas esperanzas de que el substrato complejo de la FA se pueda curar con un procedimiento de ablación relativamente sencillo.<sup>174, 175</sup> Como se ha dicho, los resultados no sólo de Narayan et al.,<sup>94, 97</sup> sino de más recientemente de Haïssaguerre et al.,<sup>89</sup> que muestran que la ablación localizada de elementos o regiones dirigiendo la FA la hacen terminar (prueba de causalidad), parecen invalidar una actividad desorganizada y aleatoria como directora de la FA. Esto no quiere decir, que no suceda lo que estos investigadores describen, pero probablemente suceda en áreas alejadas de las que realmente dirigen la FA.

### La postura de Kalman

El grupo de Kalman mostró recientemente resultados similares a los de Allesie/de Groot, defendiendo una activación desorganizada, aunque adicionalmente observaron actividad focal y reentrante no sostenida, esta última compatible con rotores (**Figura 5 del Capítulo 5**).<sup>190</sup> De hecho en un editorial reciente, sostiene que con la evidencia disponible a día de hoy, la contribución relativa de los rotores sostenidos o transitorios, de los focos y de los *multiple wavelets*, todavía es incierta. Sin embargo, enfatiza la necesidad de entender mejor los mecanismos de la FA persistente en vez de diseñar protocolos de ablación empíricos que no tienen en cuenta los mecanismos subyacentes a cada individuo.<sup>178</sup>

### La postura de Waldo

Uno de los últimos en discordia es el grupo de Waldo, que en un artículo aceptado justo antes de llevar esta Tesis a imprimir, y realizado con placas multielectrodo epicárdicas que cubrían un gran área de las aurículas, no defiende la ausencia de directores, sino que su análisis muestra el papel de focos estables y afloramientos dirigiendo la fibrilación. Sin embargo, descarta el posible papel de los rotores o la reentrada en general. En este estudio, se distingue entre focos sostenidos e intermitentes, que a su vez distinguen de los afloramientos por medio de elementos distintivos en la morfología de los electrogramas unipolares epicárdicos registrados. Estos afloramientos fueron todos intermitentes, habiéndolos “aleatorios” y “no aleatorios”. Las ondas generadas por estos mecanismos murieron generalmente mediante colisión o fusión de frentes en múltiples localizaciones espaciales. Aunque se observaron intentos de actividad reentrante (a los que llamó “*wannabe reentry*”), no observaron circuitos reentrantes reales en el epicardio.<sup>191</sup>

En un editorial muy interesante asociado a este artículo (*Long-Standing Persistent Atrial Fibrillation: Can We Distinguish Ectopic Activity From Reentry by Epicardial Mapping?*), de Bakker et al.<sup>200</sup> muestran la necesidad de interpretar con precaución los mapas epicárdicos de activación obtenidos con placas multielectrodo por varios motivos: i) cuando los circuitos

reentrantes son pequeños comparados con la distancia interelectrodo (y datos experimentales demuestran que lo pueden ser), el patrón de activación podría parecer focal; ii) se trata de mapas en 2D que no tienen en cuenta el papel relevante que puede tener la tercera dimensión, como hemos discutido en el **Capítulo 5** y como ha demostrado recientemente el grupo de Fedorov;<sup>51</sup> iii) aunque hay ciertas reglas aceptadas generalmente para interpretar el comportamiento del frente de activación en el punto de registro, estas reglas pueden no ser válidas en ocasiones por la anisotropía del tejido o en zonas de discontinuidad (p.e. donde un pequeño haz muscular se inserta en otro más grande). La idea aceptada generalmente es que la actividad focal epicárdica genera una onda Q en el electrograma unipolar en el lugar de localización del foco. Si se trata de un afloramiento de una onda que viene desde el endocardio, habría un onda R precediendo a la onda Q. Sin embargo donde el grosor del tejido es pequeño, la onda R podría ser minúscula y casi imposible de detectar, por lo que muchos de los “focos” detectados, podrían ser en realidad afloramientos con una onda R demasiado pequeña; iv) además, la detección de un afloramiento no es especialmente informativa de cara a dilucidar el mecanismo subyacente ya que podría estar generada por reentrada intramural o por un foco endocárdico o intramural; v) por último, el mecanismo de la FA podría estar fuertemente influenciado por los diferentes trastornos subyacentes: insuficiencia cardíaca, hipertensión, valvulopatías, síndrome de Wolff-Parkinson-White o hipertiroidismo, por poner algunos ejemplos.<sup>200</sup>

Por ello, de Bakker et al.<sup>200</sup> creen que no hay aún certeza sobre los mecanismos de la FA persistente en el humano. Los datos de Waldo muestran que no hay macroreentrada en el epicardio, pero no excluyen en absoluto la posibilidad de que haya microreentrada, reentrada intramural, o incluso disociación endo-epicárdica.

### **La postura de Cox**

Hay otras posturas muy relevantes en relación con los mecanismos subyacentes a la FA. Por ejemplo la de James L. Cox, pionero en el uso de la técnica Maze para el tratamiento quirúrgico de la FA. Esta técnica consiste en realizar lesiones en la aurícula con forma de laberinto, estando estas lo suficientemente juntas como para evitar macroreentrada auricular, pero permitiendo al impulso sinusal activar la mayor parte de las aurículas y llegar a los ventrículos a través del nodo sinusal.<sup>201</sup> En un reciente artículo de revisión,<sup>202</sup> Cox opina que todo lo que uno necesita entender para tratar la FA con éxito es lo siguiente: i) la FA paroxística es causada por ráfagas focales ectópicas y se puede tratar satisfactoriamente mediante aislamiento de venas pulmonares en la mayoría de los pacientes, como mostró Haïssaguerre en 1998;<sup>84</sup> y ii) el mantenimiento de las FA persistente y de larga duración poco tiene que ver con estas activaciones ectópicas focales sino que se debe a unos pocos circuitos macroreentrantes bien establecidos y que se autoperpetúan debido a los cambios producidos por el remodelado auricular, por lo que se requieren lesiones lineales adicionales acompañando al aislamiento de venas pulmonares para conseguir buenos resultados a largo plazo.<sup>202</sup> Aunque la evidencia reciente del grupo de Waldo parece descartar la existencia de macroreentrada epicárdica,<sup>191</sup>

Narayan y Jalife justifican el éxito de la técnica Maze en el tratamiento de la FA persistente en que los rotores necesitan una cierto espacio mínimo para mantenerse (unas dos veces el diámetro de su núcleo, ~5-10 mm), y el establecimiento del “laberinto” de lesiones podría simplemente evitar que los rotores se mantuvieran estables a lo largo del tiempo.<sup>198</sup>

### La postura de Marchlinsky

Contrariamente a la posición de Cox sobre los mecanismos que mantienen la FA persistente y de larga duración, Marchlinsky defiende un papel fundamental de las venas pulmonares incluso en estas tipologías de FA. En un artículo aceptado en *Heart Rhythm* poco antes de llevar esta Tesis a imprimir,<sup>203</sup> el grupo de Marchlinsky evalúa prospectivamente la prevalencia y distribución de disparadores (*triggers*) auriculares en pacientes con todas las tipologías de FA (1531 pacientes con paroxística, 496 con persistente y 141 con FA de larga duración). Sus principales hallazgos son los siguientes: i) al igual que en los pacientes con FA paroxística, las venas pulmonares representan el principal disparador en los pacientes con FA persistente y de larga duración; ii) se encontraron disparadores fuera de las venas pulmonares en el 11% de los pacientes, con prevalencia uniforme en todas las tipologías de FA. Sin embargo, la prevalencia de disparadores de este tipo en la aurícula izquierda, fue mayor en las FAs persistentes y de larga duración que en las FAs paroxísticas, lo que podría justificar el posible beneficio de la adición de ablación de sustrato empírica en la aurícula izquierda en este tipo de pacientes que han mostrado algunos estudios. En resumen, este estudio ensalza el papel de las venas pulmonares como el desencadenante más importante de la FA, también en las tipologías persistente y de larga duración. Es la opinión de Marchlinsky que las nuevas técnicas con bases mecanicistas descritas en el **Capítulo 5** de esta Tesis para detectar y ablacionar los potenciales directores de la FA (rotores y focos) detectados con cartografiado computacional avanzado, están todavía en fase experimental, y no han sido comparadas con la ablación de disparadores (*triggers*) en un ensayo clínico adecuadamente diseñado.<sup>203</sup>

Quizá el intento más cercano a esta comparación que solicita Marchlinsky, ha sido el estudio multicéntrico realizado por Atienza y colaboradores con 232 pacientes (RADAR-AF),<sup>88</sup> publicado recientemente en JACC, en el que se evalúa la eficacia y seguridad de la ablación de fuentes localizadas de alta frecuencia (potencialmente rotores o focos) en comparación con el aislamiento de venas pulmonares. La determinación de las localizaciones de alta frecuencia se realizó con un cartografiado punto a punto secuencial basado en sistema de navegación electroanatómico. En pacientes con FA paroxística, la ablación de localizaciones de alta frecuencia únicamente, no consiguió lograr la no-inferioridad a los 6 meses con un único procedimiento en comparación con el aislamiento de venas pulmonares. Sin embargo, tras nuevos procedimientos, no fue inferior al aislamiento de venas pulmonares de cara a las recurrencias de FA o taquicardia auricular. Además, se redujo significativamente la tasa de complicaciones graves en comparación con el grupo de aislamiento de venas. En FA persistente, no se encontraron diferencias significativas entre los 2 grupos (aislamiento de venas solamente



vs. aislamiento de venas + ablación de localizaciones de alta frecuencia), pero la adición de ablación adicional mostró una tendencia a mayores complicaciones,<sup>88</sup> lo cual era esperable teniendo en cuenta que se realizó una ablación más extensa. En el editorial que acompañó al artículo, estos resultados fueron interpretados por Santangeli y Marchlinsky como “*más evidencia a favor de un aislamiento antral de venas pulmonares en los pacientes, con independencia de si se trata de FA paroxística o persistente*”,<sup>204</sup> en línea con los resultados que muestran en su reciente artículo en *Heart Rhythm*.<sup>203</sup> Es su opinión que las futuras investigaciones deberían centrarse en cómo conseguir la confirmación no invasiva de un aislamiento efectivo de las venas pulmonares a largo plazo.

En este sentido, en el ensayo ADVISE (*Adenosine-guided pulmonary vein isolation for the treatment of paroxysmal atrial fibrillation*) la adenosina desenmascaró conducción latente en el 53% de los pacientes con FA paroxística tras el aislamiento de venas pulmonares. La ablación adicional en estos pacientes mostró una importante disminución del riesgo (-27%) de recurrencia de taquicardia auricular o FA tras un único procedimiento de ablación en estos pacientes en comparación con aquellos en los que no se realizó ablación adicional. Estos resultados parecen indicar que esta aproximación debería ser incorporada en la práctica clínica habitual.<sup>205</sup> Aunque sólo se evaluó la eficacia de esta aproximación en pacientes con FA paroxística, quizá también fuera interesante evaluarla en los pacientes con FA persistente o de larga duración, si tenemos en cuenta los datos de Marchlinsky sobre la importancia de los disparadores en las venas pulmonares también en este grupo de pacientes.<sup>203</sup>

De esta manera, tras optimizar los resultados obtenibles sólo con aislamiento de venas pulmonares, se podría identificar de manera inequívoca el “pequeño grupo de pacientes” (según Marchlinsky<sup>204</sup>) que verdaderamente no responden de manera efectiva a este tratamiento y que requerirían otras aproximaciones, como podría ser la ablación de localizaciones de alta frecuencia de Atienza et al.,<sup>88</sup> o las aproximaciones de Narayan et al. (FIRM)<sup>94</sup> o Haïssaguerre et al. (ablación de los dominios directores),<sup>89</sup> todas ellas descritas en el **Capítulo 5**.

Esta afirmación supone que las claramente subóptimas tasas de éxito del aislamiento de venas pulmonares en pacientes con FA persistente y de larga duración son debidas en un altísimo porcentaje de los pacientes, a la reconexión de las venas pulmonares, y no a otros posibles mecanismos. Esto supondría que las técnicas descritas en el **Capítulo 5** serían realmente útiles para un porcentaje mínimo de los pacientes con FA. Sin embargo, una interpretación alternativa de los resultados del ensayo RADAR-AF y de las bajas tasas de éxito a largo plazo del aislamiento de venas pulmonares en pacientes con FA persistente y de larga duración, confirmadas por el ensayo STAR-AF 2,<sup>85</sup> es que: i) el aislamiento de venas pulmonares no es la cura para todos los tipos FA; ii) confirma el hecho de que los procedimientos de ablación extensos que incluyen aislamiento de venas pulmonares predicen unos malos resultados a largo plazo; y iii) enfatiza la necesidad de buscar procedimientos con bases mecanicistas usando

cartografiado de alta resolución, para guiar estrategias de ablación menos extensas y más seguras.

En cualquier caso, no hay que olvidar que el enfoque utilizado en el ensayo RADAR-AF, aun estando basado en conceptos sólidos, tiene una clara limitación: la adquisición de los puntos con los que se construye el mapa es secuencial, lo que limita su habilidad para identificar las fuentes de alta frecuencia, ya que son a menudo dinámicas y pueden cambiar o moverse durante el tiempo de creación del mapa. Esto, conjuntamente con el hecho de que el análisis espectral y el concepto de frecuencia dominante, también tienen limitaciones importantes, podrían explicar que los resultados del ensayo RADAR-AF no fueran probablemente los esperados. Precisamente, el apartado 6.3.3 comenta lo que habría que tener en cuenta a la hora de interpretar correctamente el análisis espectral de los electrogramas de la FA.

### **Rotores: causa o consecuencia**

Pero antes de continuar, comentar que la opinión de algunos electrofisiólogos con los que he discutido sobre el papel de los rotores en la fibrilación, es que los rotores podrían no ser la causa de la fibrilación (los directores o *drivers*) sino más bien consecuencia. A esto por ejemplo se refiere Allesie en su editorial titulado “*Rotors during atrial fibrillation: drivers or bystanders?*”.<sup>176</sup> Para explicar esto, puede venir bien un ejemplo encontrado habitualmente en la naturaleza: los tornados, que en cierta manera se asemejan a un rotor. Estos tornados se mueven y destruyen lo que encuentran a su paso, pero realmente no son su propia causa, sino más bien la consecuencia de unas condiciones atmosféricas específicas que favorecen su aparición en unas regiones geográficas determinadas. Aunque consiguiéramos hacer desaparecer el ojo del tornado (el símil del rotor), si las condiciones atmosféricas siguen favoreciendo la aparición de tornados, no habríamos solucionado el problema. Algo parecido podría ocurrir en la fibrilación cardíaca. En este contexto, cobran sentido las recientes técnicas de ablación de sustrato en FA.<sup>206</sup> La resonancia magnética y el cartografiado de voltaje durante ritmo sinusal podrían desempeñar un papel importante en la localización y cuantificación de la extensión de las áreas de fibrosis,<sup>206</sup> que potencialmente podrían albergar los directores de la FA. De esta manera, el aislamiento de estas regiones (“*box isolation*”) podría impedir el mantenimiento de la FA. Sin embargo, estas técnicas también tienen sus detractores, fundamentalmente porque todavía no se ha demostrado claramente la relación causal entre fibrosis y FA, y porque el uso de resonancia magnética con realce tardío no está extendido para la evaluación de la fibrosis fundamentalmente difusa presente en la FA.<sup>207, 208</sup>

Siguiendo con el ejemplo de los tornados, podría ser que algunos rotores fueran consecuencia de ciertas condiciones específicas de sustrato anatómico o de activación en ciertas regiones del tejido, y que la eliminación puntual e individual de los mismos no eliminase la fibrilación ya que las condiciones que los generan siguen presentes. Por ejemplo, en el trabajo presentado en el **Capítulo 4** de esta Tesis, hemos visto que en la frontera entre dominios de alta

frecuencia, pueden aparecer periódicamente rotores que se mueven de manera reproducible. Sin embargo, es poco probable que estos rotores en sí mismos sean la causa de la fibrilación, sino que más bien parecen la consecuencia del choque de los frentes de alta frecuencia generados en los dominios adyacentes (ver **Figura 6** del **Capítulo 4**). Pero esto no quiere decir que no haya otros rotores dirigiendo la fibrilación, ya que los dominios adyacentes activándose a alta frecuencia podrían deberse a rotores intramurales estables, visibles o no epicárdicamente, que incluso podrían tener apariencia de afloramiento estable en el endocardio o el epicardio. De hecho, el grupo de Fedorov ha mostrado recientemente evidencia directa de micro-reentrada anatómica intramural sostenida dirigiendo la actividad fibrilatoria en tejido auricular humano, incluyendo prueba de causalidad, ya que la ablación de estas localizaciones finalizaba la actividad fibrilatoria.<sup>51</sup> Este hallazgo encaja perfectamente con los resultados de infundir adenosina en pacientes de Atienza et al.<sup>197</sup> que apoyan un mecanismo reentrante de la FA. Teniendo en cuenta esto, la opinión de este doctorando es que aunque no todos los rotores deberían ser considerados como directores de la FA, ya que muchos pueden ser consecuencia más que causa de la misma, la reentrada tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la fibrilación cardíaca en general, y de la FA en particular. Además, la presencia de rotores que se mueven y que aparecen de manera repetitiva en ciertas regiones aunque dando un número muy limitado de vueltas (Haïssaguerre et al.<sup>89</sup>), puede ser indicativa de la presencia de directores en el área adyacente (probablemente reentrada intramural) incluso aunque no sean visibles con las técnicas de registro actuales. Esto justificaría que ablacionar estas regiones finalice la FA,<sup>89</sup> incluso aunque estos rotores de vida tan corta no sean probablemente los directores de la misma.

### **6.3.3 Acerca del uso del análisis espectral para detectar las fuentes de alta frecuencia**

El análisis de frecuencia dominante puede ser una herramienta potente para el análisis de la tasa de activación en FA. Pero es importante tener en cuenta las virtudes y las limitaciones de esta técnica para que sus resultados se puedan interpretar apropiadamente. El doctorando recomienda para ello la lectura de varios interesantes artículos de Ng et al.<sup>19-21</sup> El principal beneficio del análisis de frecuencias dominantes es que se puede aplicar con facilidad a electrogramas complejos en FA y permite un análisis automatizado. La complejidad de estos electrogramas, como su amplitud, ciclo y morfología variables, puede hacer que la identificación manual de las activaciones sea difícil. En este sentido, el análisis de frecuencias dominantes permite objetivar las medidas. La robustez de este análisis en registros con variabilidad significativa en amplitud se ha validado con señales simuladas en ciertos estudios.<sup>19-21</sup>

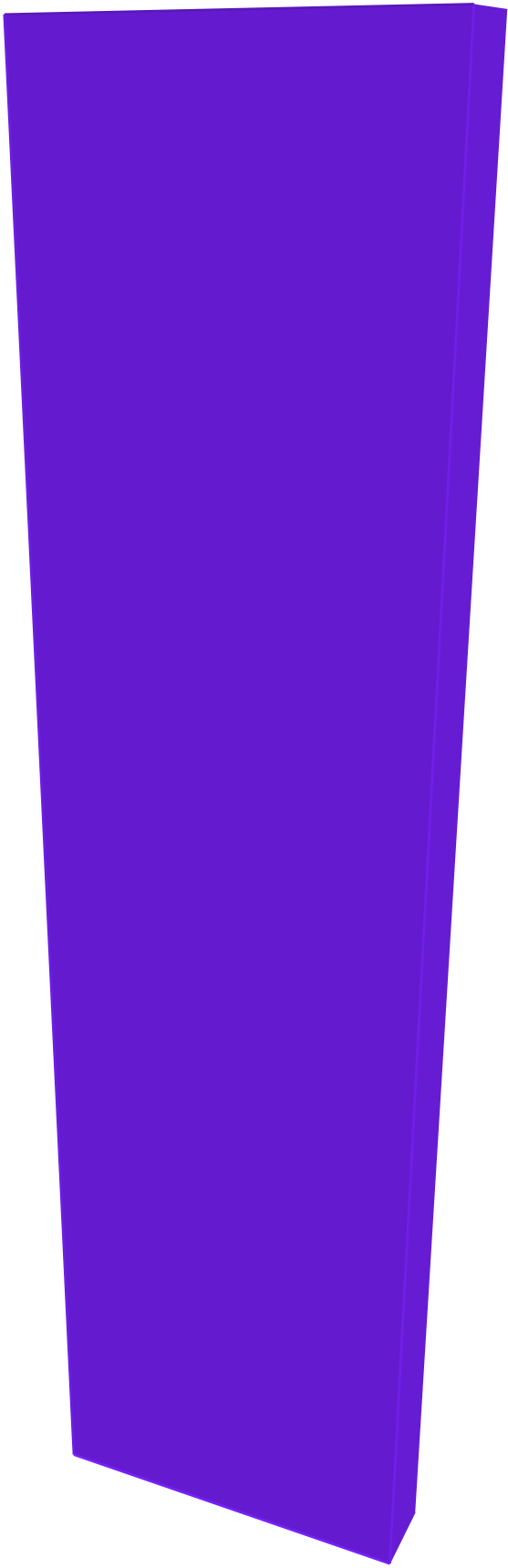
Otras propiedades comunes a los electrogramas de FA, como la alta variabilidad de los intervalos de activación y el fraccionamiento, desafortunadamente presenta mucha dificultad para el análisis frecuencias, al igual que la presentan en el análisis temporal porque las señales no se pueden caracterizar fácilmente por medio de una onda sinusoidal que corresponda a la

frecuencia de activación. Se dan situaciones similares con patrones de activación fraccionados complejos o si está presente una gran cantidad de ruido o artefacto ventricular. El análisis de frecuencias dominantes además es sensible a los cambios de fase en la señal.<sup>19-21</sup>

De esta forma, la frecuencia dominante puede salir más alta de lo que debería por otros factores diferentes a un ciclo auricular corto. Por ejemplo, como se explicó en la **Figura 2A** del **Capítulo 5**, hay que tener cuidado de no elegir como frecuencia dominante alguno de los armónicos, incluso aunque la amplitud del pico sea mayor. Además, para una correcta interpretación de los resultados es importante distinguir las activaciones rápidas de estos otros factores, como potenciales múltiples o campo lejano ventricular. Es importante darse cuenta de que si existen algunas dificultades en identificar el ciclo de la señal en el dominio del tiempo, también será probable que sea difícil su identificación en el dominio de la frecuencia. No siempre un análisis frecuencial de la señal proporciona una estimación más fiable o mejor de la tasa de activación que el análisis en el dominio del tiempo. Hay que tener en cuenta que el dominio de la frecuencia lo único que hace es reflejar cómo se puede descomponer una señal en componentes sinusoidales de diferentes frecuencias y amplitudes. Particularmente, cuando las frecuencias dominantes se usan para localizar fuentes de alta frecuencia, se debería evaluar el criterio siguiente para determinar la confianza en la estimación de la tasa de activación de la FA: i) ¿Son reproducibles las frecuencias dominantes en el punto de análisis?; ii) ¿Hay deflexiones de activación claras (sin fraccionamiento, sin potenciales múltiples, buena SNR)?; iii) ¿La tasa de activación en el dominio del tiempo corresponde a la frecuencia dominante?; iv) ¿La señal está libre de contaminación ventricular?. Si la respuesta a todas las preguntas es sí, entonces la medida de frecuencia dominantes probablemente es fiable. Si la respuesta a alguna de las preguntas es no, quizá se deberían detectar las activaciones en el dominio del tiempo para confirmar los resultados.<sup>19-21</sup> Por otra parte, el promediado de las medidas de frecuencia dominante en múltiples ventanas temporales ha mostrado una reproducibilidad mejorada y coincidencia con las tasas de activación.<sup>19-21</sup>

Este doctorando está trabajando en la actualidad en una nueva manera de interpretar los espectros de las señales de fibrilación cardiaca. A diferencia de la frecuencia dominante, que toma como mejor estimación de la tasa de activación del tejido subyacente la frecuencia a la que se encuentra el pico más alto del espectro (incluso en la presencia de varios picos de similar amplitud), nuestro enfoque se basa en un concepto diferente. Los resultados preliminares en registros de cartografiado óptico y simulaciones muestran que este nuevo enfoque consigue mejores estimaciones de la tasa de activación en el dominio del tiempo que las obtenidas mediante el uso de la frecuencia dominante. Esta estimación más precisa de la tasa de activación del tejido subyacente, podría ayudar en un futuro a mejorar los resultados obtenidos con aproximaciones de ablación de las fuentes de alta frecuencia como la de Atenza et al.<sup>88</sup> mediante una mayor sensibilidad y especificidad en la detección de estas regiones que potencialmente dirigen la fibrilación.





## Capítulo 7

# Conclusiones



A pesar de sus limitaciones, el CO ha sido y sigue siendo una herramienta fundamental para el estudio de los mecanismos subyacentes a las arritmias cardíacas con una resolución espacio-temporal extremadamente alta. Dicha herramienta nos ha permitido estudiar detalladamente los mecanismos de las arritmias en modelos experimentales porcinos de insuficiencia cardíaca y fibrilación ventricular. Más específicamente:

En nuestro modelo porcino de insuficiencia cardíaca (**Capítulo 3**), podemos concluir que:

- Aunque completamente diferentes a nivel iónico y molecular, el remodelado electrofisiológico de la insuficiencia cardíaca y los incrementos agudos de la presión intraventricular, poseen algunos efectos similares a nivel tisular. Ambos contribuyeron a favorecer el sustrato para la reentrada, disminuyendo la velocidad de conducción y la longitud de onda de la propagación y aumentando la dispersión de la repolarización.
- Ambos factores incrementaron de forma similar las probabilidades de inducir arritmias ventriculares sostenidas en más de 6 veces.
- La perfusión acidificada y adrenérgica simulando el medio extracelular en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, acortó el potencial de acción e incrementó la heterogeneidad tanto intra- como inter-sujeto, pero no pareció contribuir más allá al sustrato que favorece la reentrada.
- Estos datos, junto con los obtenidos recientemente por Reiter y colaboradores en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica,<sup>66</sup> ponen de manifiesto la contribución potencialmente importante de las presiones intraventriculares aumentadas, en la muerte súbita en la insuficiencia cardíaca.

En nuestro modelo porcino de fibrilación ventricular (**Capítulo 4**), podemos concluir que:

- Tras abrir farmacológicamente los canales de potasio sensibles a ATP, las frecuencias de la FV se duplicaron y la activación se hizo muy organizada en regiones mayoritariamente dirigidas por rotores muy estables en tiempo y espacio. Estas regiones estaban rodeadas de zonas periféricas con activación irregular que mostraban conducción fibrilatoria y rotura de frentes.
- Se observó claramente un "fenómeno de batido" de frecuencias, relacionado con la aparición cuasi-periódica de rotores que recorrían la frontera entre dominios de alta frecuencia. Dicho fenómeno se manifestó como una modulación de amplitud periódica de



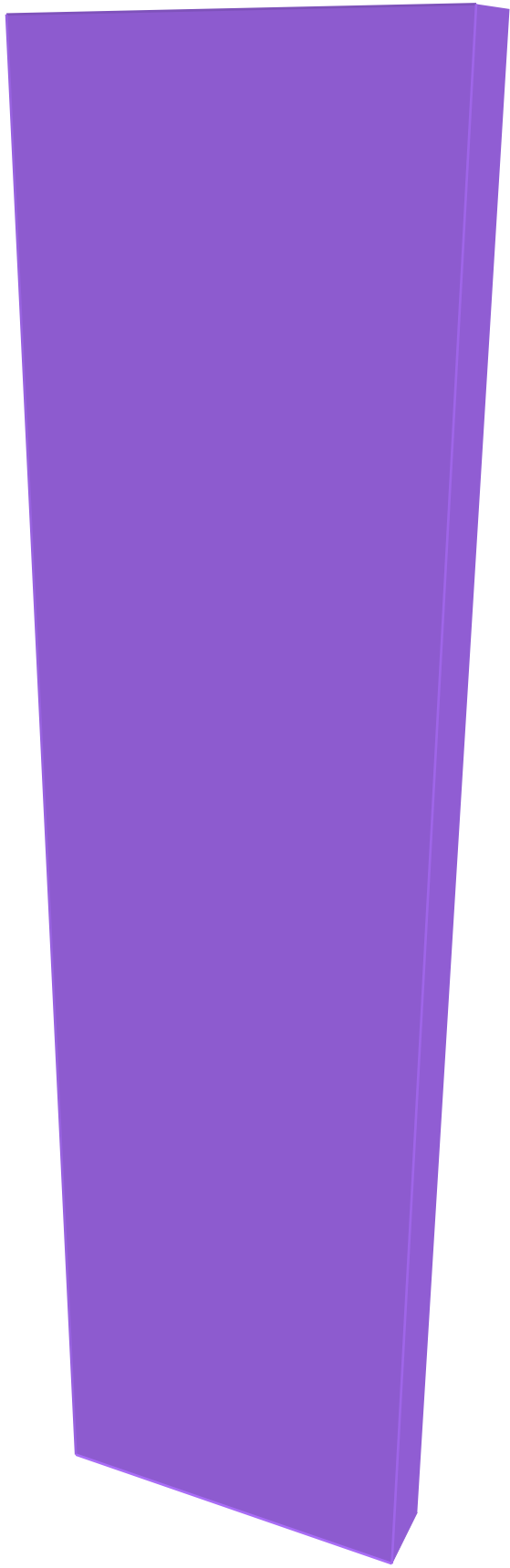
la envolvente óptica, que disminuía cuando un rotor se acercaba al punto bajo estudio y aumentaba cuando éste se alejaba.

- No se observaron diferencias anatómicas reproducibles en las frecuencias de activación, organización de la FV, ubicación de los rotores o en su dinámica.
- Todo ello demuestra, al menos bajo ciertas condiciones, la viabilidad de una FV claramente dirigida por rotores estables y epicárdicamente detectables en un corazón de mamífero cuyo tamaño es similar al del humano.

Por último, resaltar que recientemente se han publicado varios estudios de cartografiado y ablación de la FA en pacientes, con bases mecanicistas y con resultados muy prometedores. En estos estudios, revisados en el **Capítulo 5**, se han usado sistemas de cartografía y ablación dirigidos específicamente a detectar y ablacionar un número limitado de fuentes (rotores y focos) o dominios que los albergan y que potencialmente mantienen la FA. Estos sistemas basados en diferentes técnicas de registro (secuencial punto a punto, con catéteres *basket*, con potenciales superficiales de torso o con imagen electrocardiográfica) pueden considerarse en cierta medida herederos del CO, ya que comparten el uso de algoritmos, que como el análisis espectral o el cartografiado de fases, fueron desarrollados originalmente gracias a las necesidades detectadas en los estudios de CO llevados a cabo durante los últimos 25 años. El conjunto de todos estos estudios con animales, con simulaciones por ordenador y con pacientes, han hecho ir apareciendo evidencia creciente a favor de que la FA es mantenida por fuentes organizadas. Queda por resolver si esas fuentes son: i) uno o varios rotores o reentradas intramurales microanatómicas estacionarias y estables; ii) múltiples rotores de corta duración surgiendo de forma iterativa en ciertas regiones; iii) focos ectópicos o afloramientos estables; o, iv) estallidos de actividad focal, cortos pero repetitivos y reproducibles espacialmente. Curiosamente, algunos de estos mecanismos subyacentes, aparentemente diferentes, podrían converger si se consideran: i) los diferentes enfoques de cartografiado, filtrado e interpolación que se utilizan para visualizar la información eléctrica auricular en los diferentes estudios; ii) la naturaleza tridimensional del tejido auricular; y iii) las imperfecciones de los sistemas de registro que se utilizan.







## Bibliografía



1. Efimov IR, Nikolski VP, Salama G. Optical imaging of the heart. *Circ Res*. 2004;95:21-33.
2. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007;55:113-126.
3. Zimmer HG. The isolated perfused heart and its pioneers. *News Physiol Sci*. 1998;13:203-210.
4. Morad M, Salama G. Optical probes of membrane potential in heart muscle. *J Physiol*. 1979;292:267-295.
5. Salama G, Lombardi R, Elson J. Maps of optical action potentials and NADH fluorescence in intact working hearts. *Am J Physiol*. 1987;252:H384-394.
6. Efimov IR, Huang DT, Rendt JM, Salama G. Optical mapping of repolarization and refractoriness from intact hearts. *Circulation*. 1994;90:1469-1480.
7. Jalife J, Rosebaum D. Optical mapping of cardiac excitation and arrhythmias. *Wiley-Blackwell*; 2001.
8. Schaffer P, Ahammer H, Muller W, Koidl B, Windisch H. Di-4-Anepps causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes. *Pflügers Arch*. 1994;426:548-551.
9. Rohr S, Salzberg BM. Multiple site optical recording of transmembrane voltage (msortv) in patterned growth heart cell cultures: Assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale. *Biophys J*. 1994;67:1301-1315.
10. Matiukas A, Mitrea BG, Qin M, Pertsov AM, Shvedko AG, Warren MD, Zaitsev AV, Wuskell JP, Wei MD, Watras J, Loew LM. Near-infrared voltage-sensitive fluorescent dyes optimized for optical mapping in blood-perfused myocardium. *Heart Rhythm*. 2007;4:1441-1451.
11. Salama G, Choi BR, Azour G, Lavasani M, Tumbeva V, Salzberg BM, Patrick MJ, Ernst LA, Waggoner AS. Properties of new, long-wavelength, voltage-sensitive dyes in the heart. *J Membr Biol*. 2005;208:125-140.

12. Herron TJ, Lee P, Jalife J. Optical imaging of voltage and calcium in cardiac cells & tissues. *Circ Res*. 2012;110:609-623.
13. Curiel-Llamazares C, Alosa-Atienza F, Quintanilla J. Sistema de cartografiado óptico en corazones grandes perfundidos con sangre para registro simultáneo de potenciales transmembrana y transitorios de calcio mediante un único fotodetector CCD. 2013
14. Lee P, Bollensdorff C, Quinn TA, Wuskell JP, Loew LM, Kohl P. Single-sensor system for spatially resolved, continuous, and multiparametric optical mapping of cardiac tissue. *Heart Rhythm*. 2011;8:1482-1491.
15. Girouard SD, Laurita KR, Rosenbaum DS. Unique properties of cardiac action potentials recorded with voltage-sensitive dyes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1996;7:1024-1038.
16. Litwiller D. CCD vs. CMOS: Facts and fiction. 2001
17. Mironov SF, Vetter FJ, Pertsov AM. Fluorescence imaging of cardiac propagation: Spectral properties and filtering of optical action potentials. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H327-H335.
18. Berenfeld O, Mandapati R, Dixit S, Skanes AC, Chen J, Mansour M, Jalife J. Spatially distributed dominant excitation frequencies reveal hidden organization in atrial fibrillation in the langendorff-perfused sheep heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000;11:869-879.
19. Ng J, Goldberger JJ. Understanding and interpreting dominant frequency analysis of af electrograms. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007;18:680-685.
20. Ng J, Kadish AH, Goldberger JJ. Effect of electrogram characteristics on the relationship of dominant frequency to atrial activation rate in atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2006;3:1295-1305.
21. Ng J, Kadish AH, Goldberger JJ. Technical considerations for dominant frequency analysis. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007;18:757-764.

22. Zaitsev AV, Berenfeld O, Mironov SF, Jalife J, Pertsov AM. Distribution of excitation frequencies on the epicardial and endocardial surfaces of fibrillating ventricular wall of the sheep heart. *Circ Res*. 2000;86:408-417.
23. Everett THt, Kok LC, Vaughn RH, Moorman JR, Haines DE. Frequency domain algorithm for quantifying atrial fibrillation organization to increase defibrillation efficacy. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2001;48:969-978.
24. Fischer G, Hintringer F. Letter regarding article by Sanders et al, "spectral analysis identifies sites of high-frequency activity maintaining atrial fibrillation in humans". *Circulation*. 2006;113:e44, author reply e44-45.
25. Barquero-Perez O, Rojo-Alvarez JL, Caamano AJ, Goya-Esteban R, Everss E, Alonso-Atienza F, Sanchez-Munoz JJ, Garcia-Alberola A. Fundamental frequency and regularity of cardiac electrograms with fourier organization analysis. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2010;57:2168-2177.
26. Quintanilla JG, Moreno J, Archondo T, Chin A, Pérez-Castellano N, Usandizaga E, García-Torrent MJ, Molina-Morúa R, González P, Rodríguez-Bobada C, Macaya C, Pérez-Villacastín J.  $K_{ATP}$  channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2013;99:576-585.
27. Umapathy K, Nair K, Masse S, Krishnan S, Rogers J, Nash MP, Nanthakumar K. Phase mapping of cardiac fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2010;3:105-114.
28. Berenfeld O, Oral H. The quest for rotors in atrial fibrillation: Different nets catch different fishes. *Heart Rhythm*. 2012;9:1440-1441.
29. Bray MA, Wikswo JP. Considerations in phase plane analysis for nonstationary reentrant cardiac behavior. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2002;65:051902.
30. Filgueiras-Rama D, Martins RP, Mironov S, Yamazaki M, Calvo CJ, Ennis SR, Bandaru K, Noujaim SF, Kalifa J, Berenfeld O, Jalife J. Chloroquine terminates stretch-induced atrial fibrillation more effectively than flecainide in the sheep heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:561-570.



31. Knisley SB, Justice RK, Kong W, Johnson PL. Ratiometry of transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H1421-1433.
32. Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res*. 2001;88:1159-1167.
33. Fast VG. Simultaneous optical imaging of membrane potential and intracellular calcium. *J Electrocardiol*. 2005;38:107-112.
34. Del Nido PJ, Glynn P, Buenaventura P, Salama G, Koretsky AP. Fluorescence measurement of calcium transients in perfused rabbit heart using rhod 2. *Am J Physiol*. 1998;274:H728-H741.
35. Wokosin DL, Loughrey CM, Smith GL. Characterization of a range of fura dyes with two-photon excitation. *Biophys J*. 2004;86:1726-1738.
36. Laurita KR, Singal A. Mapping action potentials and calcium transients simultaneously from the intact heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2053-2060.
37. Hoeker GS, Katra RP, Laurita KR. Imaging cellular calcium dysfunction in the heart using multi-modal optical mapping. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;1:571-575.
38. Kong W, Walcott GP, Smith WM, Johnson PL, Knisley SB. Emission ratiometry for simultaneous calcium and action potential measurements with coloaded dyes in rabbit hearts: Reduction of motion and drift. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:76-82.
39. Warren M, Huizar JF, Shvedko AG, Zaitsev AV. Spatiotemporal relationship between intracellular  $Ca^{2+}$  dynamics and wave fragmentation during ventricular fibrillation in isolated blood-perfused pig hearts. *Circ Res*. 2007;101:e90-101.
40. Lee P, Yan P, Ewart P, Kohl P, Loew LM, Bollensdorff C. Simultaneous measurement and modulation of multiple physiological parameters in the isolated heart using optical techniques. *Pflügers Arch*. 2012;464:403-414.

41. Baxter WT, Mironov SF, Zaitsev AV, Jalife J, Pertsov AM. Visualizing excitation waves inside cardiac muscle using transillumination. *Biophys J*. 2001;80:516-530.
42. Hooks DA, LeGrice IJ, Harvey JD, Smaill BH. Intramural multisite recording of transmembrane potential in the heart. *Biophys J*. 2001;81:2671-2680.
43. Byars JL, Smith WM, Ideker RE, Fast VG. Development of an optrode for intramural multisite optical recordings of vm in the heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:1196-1202.
44. Idriss SF, Pitruzzello AM. A low-cost high-efficiency fiber-optic coupler for recording action potentials within the myocardial wall. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2006;53:1708-1711.
45. Brown NH, Dobrovolny HM, Gauthier DJ, Wolf PD. A fiber-based ratiometric optical cardiac mapping channel using a diffraction grating and split detector. *Biophys J*. 2007;93:254-263.
46. Hyatt CJ, Mironov SF, Vetter FJ, Zemlin CW, Pertsov AM. Optical action potential upstroke morphology reveals near-surface transmural propagation direction. *Circ Res*. 2005;97:277-284.
47. Pertsov AM, Zemlin CW, Hyatt CJ, Bernus O. What can we learn from the optically recorded epicardial action potential? *Biophys J*. 2006;91:3959-3960.
48. Hyatt CJ, Mironov SF, Wellner M, Berenfeld O, Popp AK, Weitz DA, Jalife J, Pertsov AM. Synthesis of voltage-sensitive fluorescence signals from three-dimensional myocardial activation patterns. *Biophys J*. 2003;85:2673-2683.
49. Bishop MJ, Rodriguez B, Eason J, Whiteley JP, Trayanova N, Gavaghan DJ. Synthesis of voltage-sensitive optical signals: Application to panoramic optical mapping. *Biophys J*. 2006;90:2938-2945.
50. Lou Q, Hansen BJ, Fedorenko O, Csepe TA, Kalyanasundaram A, Li N, Hage LT, Glukhov AV, Billman GE, Weiss R, Mohler PJ, Gyorke S, Biesiadecki BJ, Carnes CA, Fedorov VV. Upregulation of adenosine a1 receptors facilitates sinoatrial node dysfunction in chronic canine heart failure by exacerbating nodal conduction

- abnormalities revealed by novel dual-sided intramural optical mapping. *Circulation*. 2014;130:315-324.
51. Hansen BJ, Zhao J, Csepe TA, Moore BT, Li N, Jayne LA, Kalyanasundaram A, Lim P, Bratasz A, Powell KA, Simonetti OP, Higgins RS, Kilic A, Mohler PJ, Janssen PM, Weiss R, Hummel JD, Fedorov VV. Atrial fibrillation driven by micro-anatomic intramural re-entry revealed by simultaneous sub-epicardial and sub-endocardial optical mapping in explanted human hearts. *Eur Heart J*. 2015;36:2390-2401.
  52. Bourgeois EB, Reeves HD, Walcott GP, Rogers JM. Panoramic optical mapping shows wavebreak at a consistent anatomical site at the onset of ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2012;93:272-279.
  53. Kay MW, Rogers JM. Epicardial rotors in panoramic optical maps of fibrillating swine ventricles. *Conf.Proc.IEEE Eng Med.Biol.Soc*. 2006;1:2268-2271.
  54. Kay MW, Walcott GP, Gladden JD, Melnick SB, Rogers JM. Lifetimes of epicardial rotors in panoramic optical maps of fibrillating swine ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H1935-H1941.
  55. Rogers JM, Walcott GP, Gladden JD, Melnick SB, Ideker RE, Kay MW. Epicardial wavefronts arise from widely distributed transient sources during ventricular fibrillation in the isolated swine heart. *New J Phys*. 2008;10:015004.
  56. Rogers JM, Walcott GP, Gladden JD, Melnick SB, Kay MW. Panoramic optical mapping reveals continuous epicardial reentry during ventricular fibrillation in the isolated swine heart. *Biophys J*. 2007;92:1090-1095.
  57. Kay MW, Amison PM, Rogers JM. Three-dimensional surface reconstruction and panoramic optical mapping of large hearts. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2004;51:1219-1229.
  58. Filgueiras-Rama D, Martins RP, Ennis SR, Mironov S, Jiang J, Yamazaki M, Kalifa J, Jalife J, Berenfeld O. High-resolution endocardial and epicardial optical mapping in a sheep model of stretch-induced atrial fibrillation. *J Vis Exp*. 2011
  59. Filgueiras-Rama D, Price NF, Martins RP, Yamazaki M, Avula UM, Kaur K, Kalifa J, Ennis SR, Hwang E, Devabhaktuni V, Jalife J, Berenfeld O. Long-term frequency

- gradients during persistent atrial fibrillation in sheep are associated with stable sources in the left atrium. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;5:1160-1167.
60. Lane RE, Cowie MR, Chow AW. Prediction and prevention of sudden cardiac death in heart failure. *Heart.* 2005;91:674-680.
  61. Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* 2004;61:208-217.
  62. Hussain W, Patel PM, Chowdhury RA, Cabo C, Ciaccio EJ, Lab MJ, Duffy HS, Wit AL, Peters NS. The renin-angiotensin system mediates the effects of stretch on conduction velocity, connexin43 expression, and redistribution in intact ventricle. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2010;21:1276-1283.
  63. Reiter MJ, Landers M, Zetelaki Z, Kirchhof CJ, Allessie MA. Electrophysiological effects of acute dilatation in the isolated rabbit heart: Cycle length-dependent effects on ventricular refractoriness and conduction velocity. *Circulation.* 1997;96:4050-4056.
  64. Reiter MJ, Synhorst DP, Mann DE. Electrophysiological effects of acute ventricular dilatation in the isolated rabbit heart. *Circ Res.* 1988;62:554-562.
  65. Zabel M, Portnoy S, Franz MR. Effect of sustained load on dispersion of ventricular repolarization and conduction time in the isolated intact rabbit heart. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1996;7:9-16.
  66. Reiter MJ, Stromberg KD, Whitman TA, Adamson PB, Benditt DG, Gold MR. Influence of intracardiac pressure on spontaneous ventricular arrhythmias in patients with systolic heart failure: Insights from the reducehf trial. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2013;6:272-278.
  67. Vermeulen JT, McGuire MA, Opthof T, Coronel R, de Bakker JM, Kloppe C, Janse MJ. Triggered activity and automaticity in ventricular trabeculae of failing human and rabbit hearts. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1547-1554.
  68. Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, Domanski M, Troutman C, Anderson J, Johnson G, McNulty SE, Clapp-Channing N, Davidson-Ray LD, Fraulo

- ES, Fishbein DP, Luceri RM, Ip JH. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med*. 2005;352:225-237.
69. Tabereaux PB, Dosdall DJ, Ideker RE. Mechanisms of vf maintenance: Wandering wavelets, mother rotors, or foci. *Heart Rhythm*. 2009;6:405-415.
  70. Samie FH, Berenfeld O, Anumonwo J, Mironov SF, Udassi S, Beaumont J, Taffet S, Pertsov AM, Jalife J. Rectification of the background potassium current: A determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation. *Circ Res*. 2001;89:1216-1223.
  71. Garfinkel A, Kim YH, Voroshilovsky O, Qu Z, Kil JR, Lee MH, Karagueuzian HS, Weiss JN, Chen PS. Preventing ventricular fibrillation by flattening cardiac restitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97:6061.
  72. Li L, Jin Q, Huang J, Cheng KA, Ideker RE. Intramural foci during long duration fibrillation in the pig ventricle. *Circ Res*. 2008;102:1256-1264.
  73. Ideker RE, Huang J. Our search for the porcine mother rotor. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2005;10:7-15.
  74. Thomas SP, Thiagalingam A, Wallace E, Kovoov P, Ross DL. Organization of myocardial activation during ventricular fibrillation after myocardial infarction: Evidence for sustained high-frequency sources. *Circulation*. 2005;112:157-163.
  75. Zaitsev AV, Guha PK, Sarmast F, Kolli A, Berenfeld O, Pertsov AM, de G, Jr., Coronel R, Jalife J. Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circ Res*. 2003;92:546-553.
  76. Nanthakumar K, Jalife J, Masse S, Downar E, Pop M, Asta J, Ross H, Rao V, Mironov S, Sevaptisidis E, Rogers J, Wright G, Dhopeshwarkar R. Optical mapping of langendorff-perfused human hearts: Establishing a model for the study of ventricular fibrillation in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H875-H880.
  77. Nash MP, Mourad A, Clayton RH, Sutton PM, Bradley CP, Hayward M, Paterson DJ, Taggart P. Evidence for multiple mechanisms in human ventricular fibrillation. *Circulation*. 2006;114:536-542.

78. Nair K, Umapathy K, Farid T, Masse S, Mueller E, Sivanandan RV, Poku K, Rao V, Nair V, Butany J, Ideker RE, Nanthakumar K. Intramural activation during early human ventricular fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011;4:692-703.
79. Hou L, Deo M, Furspan P, Pandit SV, Mironov S, Auerbach DS, Gong Q, Zhou Z, Berenfeld O, Jalife J. A major role for hERG in determining frequency of reentry in neonatal rat ventricular myocyte monolayer. *Circ Res*. 2010;107:1503-1511.
80. Noujaim SF, Pandit SV, Berenfeld O, Vikstrom K, Cerrone M, Mironov S, Zugermayr M, Lopatin AN, Jalife J. Up-regulation of the inward rectifier K<sup>+</sup> current (I<sub>K1</sub>) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol*. 2007;578:315-326.
81. Uchida T, Yashima M, Gotoh M, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN, Fishbein MC, Mandel WJ, Chen PS, Karagueuzian HS. Mechanism of acceleration of functional reentry in the ventricle: Effects of ATP-sensitive potassium channel opener. *Circulation*. 1999;99:704-712.
82. Farid TA, Nair K, Masse S, Azam MA, Maguy A, Lai PF, Umapathy K, Dorian P, Chauhan V, Varro A, Al-Hesayen A, Waxman M, Nattel S, Nanthakumar K. Role of K<sub>ATP</sub> channels in the maintenance of ventricular fibrillation in cardiomyopathic human hearts. *Circ Res*. 2011;109:1309-1318.
83. Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*. 2004;62:9-33.
84. Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Metayer P, Clementy J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*. 1998;339:659-666.
85. Verma A, Jiang CY, Betts TR, Chen J, Deisenhofer I, Mantovan R, Macle L, Morillo CA, Haverkamp W, Weerasooriya R, Albenque JP, Nardi S, Menardi E, Novak P, Sanders P, Star-AF II I. Approaches to catheter ablation for persistent atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2015;372:1812-1822.
86. Dewire J, Calkins H. Update on atrial fibrillation catheter ablation technologies and techniques. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10:599-612.

87. Atienza F, Almendral J, Jalife J, Zlochiver S, Ploutz-Snyder R, Torrecilla EG, Arenal A, Kalifa J, Fernández-Avilés F, Berenfeld O. Real-time dominant frequency mapping and ablation of dominant frequency sites in atrial fibrillation with left-to-right frequency gradients predicts long-term maintenance of sinus rhythm. *Heart Rhythm*. 2009;6:33-40.
88. Atienza F, Almendral J, Ormaetxe JM, Moya A, Martínez-Alday JD, Hernández-Madrid A, Castellanos E, Arribas F, Arias MA, Tercedor L, Peinado R, Arcocha MF, Ortiz M, Martínez-Alzamora N, Arenal A, Fernández-Avilés F, Jalife J, Radar-AF Investigators. Comparison of radiofrequency catheter ablation of drivers and circumferential pulmonary vein isolation in atrial fibrillation: A noninferiority randomized multicenter RADAR-AF trial. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:2455-2467.
89. Haissaguerre M, Hocini M, Denis A, Shah AJ, Komatsu Y, Yamashita S, Daly M, Amraoui S, Zellerhoff S, Picat MQ, Quotb A, Jesel L, Lim H, Ploux S, Bordachar P, Attuel G, Meillet V, Ritter P, Derval N, Sacher F, Bernus O, Cochet H, Jais P, Dubois R. Driver domains in persistent atrial fibrillation. *Circulation*. 2014;130:530-538.
90. Haissaguerre M, Hocini M, Shah AJ, Derval N, Sacher F, Jais P, Dubois R. Noninvasive panoramic mapping of human atrial fibrillation mechanisms: A feasibility report. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2013;24:711-717.
91. Narayan SM, Krummen DE, Clopton P, Shivkumar K, Miller JM. Direct or coincidental elimination of stable rotors or focal sources may explain successful atrial fibrillation ablation: On-treatment analysis of the confirm trial (conventional ablation for AF with or without focal impulse and rotor modulation). *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:138-147.
92. Narayan SM, Krummen DE, Enyeart MW, Rappel WJ. Computational mapping identifies localized mechanisms for ablation of atrial fibrillation. *PLoS One*. 2012;7:e46034.
93. Narayan SM, Krummen DE, Rappel WJ. Clinical mapping approach to diagnose electrical rotors and focal impulse sources for human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012;23:447-454.
94. Narayan SM, Krummen DE, Shivkumar K, Clopton P, Rappel WJ, Miller JM. Treatment of atrial fibrillation by the ablation of localized sources: CONFIRM (Conventional Ablation for Atrial Fibrillation With or Without Focal Impulse and Rotor Modulation) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:628-636.

95. Narayan SM, Patel J, Mulpuru S, Krummen DE. Focal impulse and rotor modulation ablation of sustaining rotors abruptly terminates persistent atrial fibrillation to sinus rhythm with elimination on follow-up: A video case study. *Heart Rhythm*. 2012;9:1436-1439.
96. Narayan SM, Shivkumar K, Krummen DE, Miller JM, Rappel WJ. Panoramic electrophysiological mapping but not electrogram morphology identifies stable sources for human atrial fibrillation: Stable atrial fibrillation rotors and focal sources relate poorly to fractionated electrograms. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013;6:58-67.
97. Narayan SM, Baykaner T, Clopton P, Schricker A, Lalani GG, Krummen DE, Shivkumar K, Miller JM. Ablation of rotor and focal sources reduces late recurrence of atrial fibrillation compared with trigger ablation alone: Extended follow-up of the CONFIRM trial. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1761-1768.
98. Yamashita S, Yoshida A, Fukuzawa K, Nakanishi T, Matsumoto A, Konishi H, Ichibori H, Hyogo K, Imada H, Hirata K. The relationship between cardiac vulnerability and restitution properties of the ventricular activation recovery interval. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2015;26:768-773.
99. Maruyama T, Kubota S. Action potential duration, activation-recovery interval and effective refractoriness: A well known but unresolved trinity. *Circ J*. 2002;66:308-309.
100. Chinushi M, Washizuka T, Hosaka Y, Furushima H, Tanabe Y, Chinushi Y, Aizawa Y. Activation-recovery interval as a parameter to assess the intracardiac ventricular repolarization in patients with congenital long qt syndrome. *Am J Cardiol*. 2002;90:432-435.
101. Chinushi M, Tagawa M, Kasai H, Washizuka T, Abe A, Furushima H, Aizawa Y. Correlation between the effective refractory period and activation-recovery interval calculated from the intracardiac unipolar electrogram of humans with and without di-sotalol treatment. *Jpn Circ J*. 2001;65:702-706.
102. Glukhov AV, Fedorov VV, Kalish PW, Ravikumar VK, Lou Q, Janks D, Schuessler RB, Moazami N, Efimov IR. Conduction remodeling in human end-stage nonischemic left ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. 2012;125:1835-1847.



103. Glukhov AV, Fedorov VV, Lou Q, Ravikumar VK, Kalish PW, Schuessler RB, Moazami N, Efimov IR. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle. *Circ Res*. 2010;106:981-991.
104. Tranquillo JV, Franz MR, Knollmann BC, Henriquez AP, Taylor DA, Henriquez CS. Genesis of the monophasic action potential: Role of interstitial resistance and boundary gradients. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1370-1381.
105. Knollmann BC, Tranquillo J, Sirenko SG, Henriquez C, Franz MR. Microelectrode study of the genesis of the monophasic action potential by contact electrode technique. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2002;13:1246-1252.
106. Franz MR. Current status of monophasic action potential recording: Theories, measurements and interpretations. *Cardiovasc Res*. 1999;41:25-40.
107. Franz MR. Bridging the gap between basic and clinical electrophysiology: What can be learned from monophasic action potential recordings? *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1994;5:699-710.
108. Franz MR. Method and theory of monophasic action potential recording. *Prog Cardiovasc Dis*. 1991;33:347-368.
109. Efimov IR, Gray RA, Roth BJ. Virtual electrodes and deexcitation: New insights into fibrillation induction and defibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000;11:339-353.
110. Efimov IR, Cheng YN, Biermann M, Van Wagoner DR, Mazgalev TN, Tchou PJ. Transmembrane voltage changes produced by real and virtual electrodes during monophasic defibrillation shock delivered by an implantable electrode. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1997;8:1031-1045.
111. Efimov IR, Cheng Y, Yamanouchi Y, Tchou PJ. Direct evidence of the role of virtual electrode-induced phase singularity in success and failure of defibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000;11:861-868.
112. Efimov IR, Cheng Y, Van Wagoner DR, Mazgalev T, Tchou PJ. Virtual electrode-induced phase singularity: A basic mechanism of defibrillation failure. *Circ Res*. 1998;82:918-925.

113. Efimov IR, Aguel F, Cheng Y, Wollenzier B, Trayanova N. Virtual electrode polarization in the far field: Implications for external defibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H1055-1070.
114. Efimov IR. Chronaxie of defibrillation: A pathway toward further optimization of defibrillation waveform? *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2009;20:315-317.
115. Efimov IR. Virtual electrodes in virtual reality of defibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2002;13:680-681.
116. Efimov IR. A shocking experience: Ionic modulation of virtual electrodes in defibrillation. *Circ Res*. 2000;87:429-430.
117. Cheng Y, Mowrey KA, Van Wagoner DR, Tchou PJ, Efimov IR. Virtual electrode-induced reexcitation: A mechanism of defibrillation. *Circ Res*. 1999;85:1056-1066.
118. Cheng Y, Mowrey KA, Nikolski V, Tchou PJ, Efimov IR. Mechanisms of shock-induced arrhythmogenesis during acute global ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H2141-2151.
119. Cakulev I, Efimov IR, Waldo AL. Cardioversion: Past, present, and future. *Circulation*. 2009;120:1623-1632.
120. Boukens BJ, Gutbrod SR, Efimov IR. Imaging of ventricular fibrillation and defibrillation: The virtual electrode hypothesis. *Adv Exp Med Biol*. 2015;859:343-365.
121. Lou Q, Li W, Efimov IR. The role of dynamic instability and wavelength in arrhythmia maintenance as revealed by panoramic imaging with blebbistatin vs. 2,3-butanedione monoxime. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H262-H269.
122. Liao J, Dumas J, Janks D, Roth BJ, Knisley SB. Cardiac optical mapping under a translucent stimulation electrode. *Ann Biomed Eng*. 2004;32:1202-1210.
123. Oppenheim A, Schaffer R, Buck J. Discrete-time signal processing. *Prentice Hall*. 1999

124. Bachtel AD, Gray RA, Stohlman JM, Bourgeois EB, Pollard AE, Rogers JM. A novel approach to dual excitation ratiometric optical mapping of cardiac action potentials with di-4-aneppts using pulsed led excitation. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2011;58:2120-2126.
125. Himel HDt, Knisley SB. Imaging of cardiac movement using ratiometric and nonratiometric optical mapping: Effects of ischemia and 2, 3-butanedione monoxime. *IEEE Trans Med Imaging.* 2006;25:122-127.
126. Tai DC, Caldwell BJ, LeGrice IJ, Hooks DA, Pullan AJ, Smaill BH. Correction of motion artifact in transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H985-993.
127. Fedorov VV, Lozinsky IT, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Rosen MR, Balke CW, Efimov IR. Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm.* 2007;4:619-626.
128. Brack KE, Narang R, Winter J, Ng GA. The mechanical uncoupler blebbistatin is associated with significant electrophysiological effects in the isolated rabbit heart. *Exp Physiol.* 2013;98:1009-1027.
129. Swift LM, Asfour H, Posnack NG, Arutunyan A, Kay MW, Sarvazyan N. Properties of blebbistatin for cardiac optical mapping and other imaging applications. *Pflugers Arch.* 2012;464:503-512.
130. Brines L, Such-Miquel L, Gallego D, Trapero I, Del C, I, Zarzoso M, Soler C, Pelechano F, Canoves J, Alberola A, Such L, Chorro FJ. Modifications of mechanoelectric feedback induced by 2,3-butanedione monoxime and blebbistatin in langendorff-perfused rabbit hearts. *Acta Physiol (Oxf).* 2012;206:29-41.
131. Yamazaki M, Vaquero LM, Hou L, Campbell K, Zlochiver S, Klos M, Mironov S, Berenfeld O, Honjo H, Kodama I, Jalife J, Kalifa J. Mechanisms of stretch-induced atrial fibrillation in the presence and the absence of adrenergic stimulation: Interplay between rotors and focal discharges. *Heart Rhythm.* 2009;6:1009-1017.
132. Yamazaki M, Mironov S, Taravant C, Brec J, Vaquero LM, Bandaru K, Avula UM, Honjo H, Kodama I, Berenfeld O, Kalifa J. Heterogeneous atrial wall thickness and stretch promote scroll waves anchoring during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2012;94:48-57.

133. Yamazaki M, Filgueiras-Rama D, Berenfeld O, Kalifa J. Ectopic and reentrant activation patterns in the posterior left atrium during stretch-related atrial fibrillation. *Prog Biophys Mol Biol*. 2012;110:269-277.
134. Jalife J. Inward rectifier potassium channels control rotor frequency in ventricular fibrillation. *Heart Rhythm*. 2009;6:S44-S48.
135. Warren M, Guha PK, Berenfeld O, Zaitsev A, Anumonwo JM, Dhamoon AS, Bagwe S, Taffet SM, Jalife J. Blockade of the inward rectifying potassium current terminates ventricular fibrillation in the guinea pig heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:621-631.
136. Dhamoon AS, Jalife J. The inward rectifier current ( $I_{K1}$ ) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm*. 2005;2:316-324.
137. Milstein ML, Musa H, Balbuena DP, Anumonwo JM, Auerbach DS, Furspan PB, Hou L, Hu B, Schumacher SM, Vaidyanathan R, Martens JR, Jalife J. Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:E2134-E2143.
138. Bingen BO, Askar SF, Schalij MJ, Kazbanov IV, Ypey DL, Panfilov AV, Pijnappels DA. Prolongation of minimal action potential duration in sustained fibrillation decreases complexity by transient destabilization. *Cardiovasc Res*. 2013;97:161-170.
139. Takanari H, Nalos L, Stary-Weinzinger A, de Git KC, Varkevisser R, Linder T, Houtman MJ, Peschar M, de Boer TP, Tidwell RR, Rook MB, Vos MA, van der Heyden MA. Efficient and specific cardiac  $I_{K1}$  inhibition by a new pentamidine analogue. *Cardiovasc.Res*. 2013
140. Fedorov VV, Glukhov AV, Ambrosi CM, Kosteki G, Chang R, Janks D, Schuessler RB, Moazami N, Nichols CG, Efimov IR. Effects of katp channel openers diazoxide and pinacidil in coronary-perfused atria and ventricles from failing and non-failing human hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:215-225.
141. Aronson D, Mittleman MA, Burger AJ. Effects of sulfonylurea hypoglycemic agents and adenosine triphosphate dependent potassium channel antagonists on ventricular

- arrhythmias in patients with decompensated heart failure. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2003;26:1254-1261.
142. Jalife J. And the beat goes on...The beat goes on: Organization and quasi-periodicity in ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2013;99:375-377.
  143. Brown DA, O'Rourke B. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 2010;88:241-249.
  144. Billman GE. The cardiac sarcolemmal atp-sensitive potassium channel as a novel target for anti-arrhythmic therapy. *Pharmacol Ther.* 2008;120:54-70.
  145. Rainbow RD, Norman RI, Hudman D, Davies NW, Standen NB. Reduced effectiveness of hmr 1098 in blocking cardiac sarcolemmal k(atp) channels during metabolic stress. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2005;39:637-646.
  146. Zhang HX, Akrouh A, Kurata HT, Remedi MS, Lawton JS, Nichols CG. Hmr 1098 is not an sur isotype specific inhibitor of heterologous or sarcolemmal K ATP channels. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:552-560.
  147. Billman GE, Houle MS, Englert HC, Gogelein H. Effects of a novel cardioselective atp-sensitive potassium channel antagonist, 1-[[5-[2-(5-chloro-o-anisamido)ethyl]-beta-methoxyethoxyphenyl]sulfonyl]-3-methyl thiourea, sodium salt (HMR 1402), on susceptibility to ventricular fibrillation induced by myocardial ischemia: In vitro and in vivo studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:182-192.
  148. Dossall DJ, Tabereaux PB, Kim JJ, Walcott GP, Rogers JM, Killingsworth CR, Huang J, Robertson PG, Smith WM, Ideker RE. Chemical ablation of the purkinje system causes early termination and activation rate slowing of long-duration ventricular fibrillation in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H883-H889.
  149. Tabereaux PB, Walcott GP, Rogers JM, Kim J, Dossall DJ, Robertson PG, Killingsworth CR, Smith WM, Ideker RE. Activation patterns of purkinje fibers during long-duration ventricular fibrillation in an isolated canine heart model. *Circulation.* 2007;116:1113-1119.

150. Robichaux RP, Dosdall DJ, Osorio J, Garner NW, Li L, Huang J, Ideker RE. Periods of highly synchronous, non-reentrant endocardial activation cycles occur during long-duration ventricular fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2010;21:1266-1273.
151. Li L, Jin Q, Dosdall DJ, Huang J, Pogwizd SM, Ideker RE. Activation becomes highly organized during long-duration ventricular fibrillation in canine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298:H2046-H2053.
152. Venable PW, Taylor TG, Shibayama J, Warren M, Zaitsev AV. Complex structure of electrophysiological gradients emerging during long-duration ventricular fibrillation in the canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H1405-H1418.
153. Boyle PM, Masse S, Nanthakumar K, Vigmond EJ. Transmural  $I_{KATP}$  heterogeneity as a determinant of activation rate gradient during early ventricular fibrillation: Mechanistic insights from rabbit ventricular models. *Heart Rhythm*. 2013;10:1710-1717.
154. Pandit SV, Kaur K, Zlochiver S, Noujaim SF, Furspan P, Mironov S, Shibayama J, Anumonwo J, Jalife J. Left-to-right ventricular differences in  $I_{KATP}$  underlie epicardial repolarization gradient during global ischemia. *Heart Rhythm*. 2011;8:1732-1739.
155. Kalyanasundaram A, Fedorov VV.  $K_{ATP}$  vs purkinje fibers: Which should we shoot first, or should we? *Heart Rhythm*. 2013;10:1718-1719.
156. Taylor TG, Venable PW, Booth A, Garg V, Shibayama J, Zaitsev AV. Does the combination of hyperkalemia and  $K_{ATP}$  activation determine excitation rate gradient and electrical failure in the globally ischemic fibrillating heart? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305:H903-H912.
157. Taylor TG, Venable PW, Shibayama J, Warren M, Zaitsev AV. Role of  $K_{ATP}$  channel in electrical depression and asystole during long-duration ventricular fibrillation in ex-vivo canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012
158. Pandit SV, Zlochiver S, Filgueiras-Rama D, Mironov S, Yamazaki M, Ennis SR, Noujaim SF, Workman AJ, Berenfeld O, Kalifa J, Jalife J. Targeting atrioventricular differences in ion channel properties for terminating acute atrial fibrillation in pigs. *Cardiovasc Res*. 2011;89:843-851.

159. Li L, Zheng X, Dossall DJ, Huang J, Pogwizd SM, Ideker RE. Long-duration ventricular fibrillation exhibits 2 distinct organized states. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013;6:1192-1199.
160. Huang J, Dossall DJ, Cheng KA, Li L, Rogers JM, Ideker RE. The importance of purkinje activation in long duration ventricular fibrillation. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:e000495.
161. Omichi C, Lamp ST, Lin SF, Yang J, Baher A, Zhou S, Attin M, Lee MH, Karagueuzian HS, Kogan B, Qu Z, Garfinkel A, Chen PS, Weiss JN. Intracellular ca dynamics in ventricular fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1836-H1844.
162. Ogawa M, Lin SF, Weiss JN, Chen PS. Calcium dynamics and ventricular fibrillation. *Circ Res*. 2008;102:e52.
163. Warren M, Zaitsev AV. Evidence against the role of intracellular calcium dynamics in ventricular fibrillation. *Circ Res*. 2008;102:e103.
164. Tang L, Hwang GS, Hayashi H, Song J, Ogawa M, Kobayashi K, Joung B, Karagueuzian HS, Chen PS, Lin SF. Intracellular calcium dynamics at the core of endocardial stationary spiral waves in langendorff-perfused rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H297-H304.
165. Kong W, Ideker RE, Fast VG. Intramural optical mapping of v(m) and ca(i)2+ during long-duration ventricular fibrillation in canine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H1294-H1305.
166. Jin Q, Dossall DJ, Li L, Rogers JM, Ideker RE, Huang J. Verapamil reduces incidence of reentry during ventricular fibrillation in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307:H1361-1369.
167. Cheng KA, Dossall DJ, Li L, Rogers JM, Ideker RE, Huang J. Evolution of activation patterns during long-duration ventricular fibrillation in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H992-H1002.
168. Wang L, Myles RC, De Jesus NM, Ohlendorf AK, Bers DM, Ripplinger CM. Optical mapping of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> in the intact heart: Ryanodine receptor refractoriness during alternans and fibrillation. *Circ Res*. 2014;114:1410-1421.

169. Zamiri N, Masse S, Ramadeen A, Kusha M, Hu X, Azam MA, Liu J, Lai PF, Vigmond EJ, Boyle PM, Behradfar E, Al-Hesayen A, Waxman MB, Backx P, Dorian P, Nanthakumar K. Dantrolene improves survival after ventricular fibrillation by mitigating impaired calcium handling in animal models. *Circulation*. 2014;129:875-885.
170. Huang J, Rogers JM, Killingsworth CR, Singh KP, Smith WM, Ideker RE. Evolution of activation patterns during long-duration ventricular fibrillation in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1193-H1200.
171. Huizar JF, Warren MD, Shvedko AG, Kalifa J, Moreno J, Mironov S, Jalife J, Zaitsev AV. Three distinct phases of vf during global ischemia in the isolated blood-perfused pig heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1617-H1628.
172. Lou Q, Fedorov VV, Glukhov AV, Moazami N, Fast VG, Efimov IR. Transmural heterogeneity and remodeling of ventricular excitation-contraction coupling in human heart failure. *Circulation*. 2011;123:1881-1890.
173. Krummen DE, Hayase J, Morris DJ, Ho J, Smetak MR, Clopton P, Rappel WJ, Narayan SM. Rotor stability separates sustained ventricular fibrillation from self-terminating episodes in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:2712-2721.
174. Allesie M, de Groot N. Rebuttal from Maurits Allesie and Natasja de Groot. *J Physiol*. 2014;592:3173.
175. Allesie M, de Groot N. Crosstalk opposing view: Rotors have not been demonstrated to be the drivers of atrial fibrillation. *J Physiol*. 2014;592:3167-3170.
176. Allesie M, de Groot N. Rotors during af: Drivers or bystanders? *Eur Heart J*. 2014;35:63-65.
177. Benharash P, Buch E, Frank P, Share M, Tung R, Shivkumar K, Mandapati R. Quantitative analysis of localized sources identified by focal impulse and rotor modulation mapping in atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8:554-561.
178. Walters TE, Kalman JM. Human persistent atrial fibrillation is maintained by rotors: The jury is still out. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8:517-519.



179. Buch E, Benharash P, Frank P, Share M, Tung R, Shivkumar K, Mandapati R. Response to letter by Jalife et al regarding article, "Quantitative analysis of localized sources identified by focal impulse and rotor mapping in atrial fibrillation". *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2015;8:1299-1300.
180. Jalife J, Filgueiras-Rama D, Berenfeld O. Letter by Jalife et al regarding article, "Quantitative analysis of localized sources identified by focal impulse and rotor modulation mapping in atrial fibrillation". *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2015;8:1296-1298.
181. Buch E, Share M, Tung R, Benharash P, Sharma P, Koneru J, Mandapati R, Ellenbogen KA, Shivkumar K. Long-term clinical outcomes of focal impulse and rotor modulation for treatment of atrial fibrillation: A multi-center experience. *Heart Rhythm.* 2015 (In press)
182. Miller JM, Kowal RC, Swarup V, Daubert JP, Daoud EG, Day JD, Ellenbogen KA, Hummel JD, Baykaner T, Krummen DE, Narayan SM, Reddy VY, Shivkumar K, Steinberg JS, Wheelan KR. Initial independent outcomes from focal impulse and rotor modulation ablation for atrial fibrillation: Multicenter FIRM registry. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2014;25:921-929.
183. Shivkumar K, Ellenbogen KA, Hummel JD, Miller JM, Steinberg JS. Acute termination of human atrial fibrillation by identification and catheter ablation of localized rotors and sources: First multicenter experience of focal impulse and rotor modulation (FIRM) ablation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2012;23:1277-1285.
184. Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O, Jalife J. Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation.* 2000;101:194-199.
185. Mansour M, Mandapati R, Berenfeld O, Chen J, Samie FH, Jalife J. Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation.* 2001;103:2631-2636.
186. Skanes AC, Mandapati R, Berenfeld O, Davidenko JM, Jalife J. Spatiotemporal periodicity during atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation.* 1998;98:1236-1248.

187. Rappel WJ, Zaman JA, Narayan SM. Mechanisms for the termination of atrial fibrillation by localized ablation: Computational and clinical studies. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015 (In press)
188. Allessie MA, de Groot NM, Houben RP, Schotten U, Boersma E, Smeets JL, Crijns HJ. Electropathological substrate of long-standing persistent atrial fibrillation in patients with structural heart disease: Longitudinal dissociation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2010;3:606-615.
189. de Groot NM, Houben RP, Smeets JL, Boersma E, Schotten U, Schalij MJ, Crijns H, Allessie MA. Electropathological substrate of longstanding persistent atrial fibrillation in patients with structural heart disease: Epicardial breakthrough. *Circulation*. 2010;122:1674-1682.
190. Lee G, Kumar S, Teh A, Madry A, Spence S, Larobina M, Goldblatt J, Brown R, Atkinson V, Moten S, Morton JB, Sanders P, Kistler PM, Kalman JM. Epicardial wave mapping in human long-lasting persistent atrial fibrillation: Transient rotational circuits, complex wavefronts, and disorganized activity. *Eur Heart J*. 2014;35:86-97.
191. Lee S, Sahadevan J, Khrestian CM, Cakulev I, Markowitz A, Waldo AL. Simultaneous bi-atrial high density (510 - 512 electrodes) epicardial mapping of persistent and long-standing persistent atrial fibrillation in patients: New insights into the mechanism of its maintenance. *Circulation*. 2015
192. Davidenko JM, Pertsov AV, Salomonsz R, Baxter W, Jalife J. Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle. *Nature*. 1992;355:349-351.
193. Gray RA, Jalife J, Panfilov AV, Baxter WT, Cabo C, Davidenko JM, Pertsov AM. Mechanisms of cardiac fibrillation. *Science*. 1995;270:1222-1223; author reply 1224-1225.
194. Gray RA, Pertsov AM, Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation. *Nature*. 1998;392:75-78.
195. Pandit SV, Jalife J. Rotors and the dynamics of cardiac fibrillation. *Circ Res*. 2013;112:849-862.

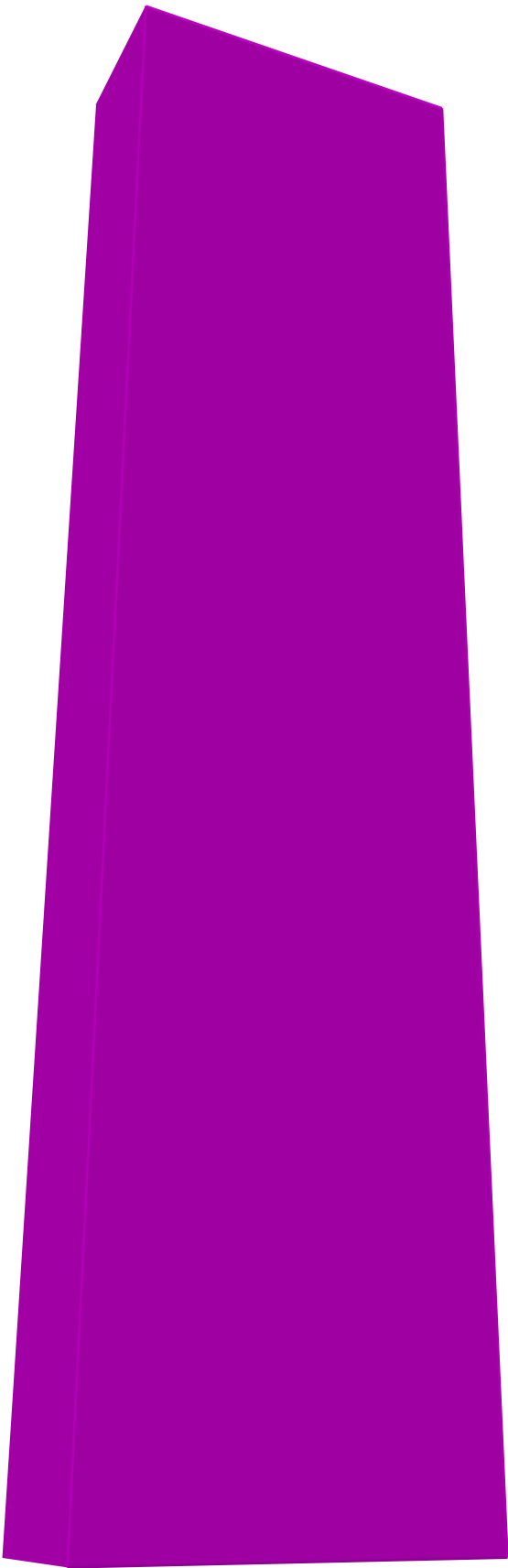
196. Skanes AC, Gray RA, Zuur CL, Jalife J. Spatio-temporal patterns of atrial fibrillation: Role of the subendocardial structure. *Semin Interv Cardiol.* 1997;2:185-193.
197. Atienza F, Almendral J, Moreno J, Vaidyanathan R, Talkachou A, Kalifa J, Arenal A, Villacastin JP, Torrecilla EG, Sanchez A, Ploutz-Snyder R, Jalife J, Berenfeld O. Activation of inward rectifier potassium channels accelerates atrial fibrillation in humans: Evidence for a reentrant mechanism. *Circulation.* 2006;114:2434-2442.
198. Narayan SM, Jalife J. Crosstalk proposal: Rotors have been demonstrated to drive human atrial fibrillation. *J Physiol.* 2014;592:3163-3166.
199. Narayan SM, Jalife J. Rebuttal from Sanjiv M. Narayan and Jose Jalife. *J Physiol.* 2014;592:3171.
200. de Bakker JM, van Dessel PF. Long-standing persistent atrial fibrillation: Can we distinguish ectopic activity from reentry by epicardial mapping? *Circulation.* 2015
201. Cox JL. The surgical treatment of atrial fibrillation. IV. Surgical technique. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;101:584-592.
202. Cox JL. A brief overview of surgery for atrial fibrillation. *Ann Cardiothorac Surg.* 2014;3:80-88.
203. Santangeli P, Zado ES, Hutchinson MD, Riley MP, Lin D, Frankel DS, Supple GE, Garcia FC, Dixit S, Callans DJ, Marchlinski FE. Prevalence and distribution of focal triggers in persistent and longstanding persistent atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2015 (In press)
204. Santangeli P, Marchlinski FE. Pulmonary vein isolation for atrial fibrillation: Forever young. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64:2468-2470.
205. Macle L, Khairy P, Weerasooriya R, Novak P, Verma A, Willems S, Arentz T, Deisenhofer I, Veenhuyzen G, Scavee C, Jais P, Puererfellner H, Levesque S, Andrade JG, Rivard L, Guerra PG, Dubuc M, Thibault B, Talajic M, Roy D, Nattel S, investigators At. Adenosine-guided pulmonary vein isolation for the treatment of paroxysmal atrial fibrillation: An international, multicentre, randomised superiority trial. *Lancet.* 2015;386:672-679.

206. Kottkamp H, Bender R, Berg J. Catheter ablation of atrial fibrillation: How to modify the substrate? *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:196-206.
207. Kottkamp H, Bender R, Berg J. Reply: Atrial fibrosis: An illusion or a true key to successful ablation of atrial fibrillation? *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:2465-2466.
208. Sramko M, Kautzner J. Atrial fibrosis: An illusion or a true key to successful ablation of atrial fibrillation? *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:2465.



# Apéndice A

## **Editoriales asociados a los artículos originales presentados**





# What can mechanics teach electricians about arrhythmias in heart failure?



Richard L. Verrier, PhD, FHRS

*From the Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts.*

In 1856, Kölliker and Mueller<sup>1</sup> demonstrated that when a motor nerve to a frog's leg was placed over an isolated beating heart, the leg kicked with each heartbeat. From this observation emerged the fundamental recognition that the heartbeat is due to a rhythmic discharge of electrical stimuli. Over the course of more than a century and a half, a vast body of knowledge has emerged describing how electrical coordination of the heartbeat through the conducting system results in an efficient apical-to-base ejection of blood into the pulmonary and systemic circulations. Disruption of this exquisitely orchestrated pattern of electrical activation of the myocardium can precipitate major cardiac events, particularly sudden arrhythmic death, which claims more than 300,000 lives annually in the United States alone.

It has become evident that electrical and mechanical relationships within the heart are bidirectional. Namely, changes in cardiac dimensions as a result of reverse excitation contraction coupling can alter the normal sequence of electrical excitation of heart muscle.<sup>2</sup> Among the most salient examples of mechano-electrical cross talk is one that involves stretch-activated calcium channels, which adaptively counteract overdistension of the atria and ventricles by enhancing contractility. Acute diastolic stretch shortens action potential duration and refractoriness.<sup>3</sup> There is an intricate relationship whereby elevated ventricular pressure results in neurohumoral activation with concomitant increases in sympathetic neural tone, which critically affects intracellular calcium cycling. Pulsus alternans, a well-established indicator of mechanical dysfunction, results in a beat-to-beat feedback that controls the duration of depolarization and repolarization to compensate for the hypodynamic state of the heart.<sup>2</sup> The major linkage between mechanical and electrical function is implied by the fact that reduced left ventricular ejection fraction, an index of mechanical function, is an indicator of risk for life-threatening arrhythmias and a key factor in consideration

of insertion of an implantable cardioverter-defibrillator.<sup>4</sup> Recently, Reiter et al<sup>5</sup> used implantable devices that permit combined monitoring of hemodynamic measures and implantable cardioverter-defibrillator discharge to study the influence of intracardiac pressure on spontaneous ventricular tachycardia/ventricular fibrillation in patients enrolled in the REDUCEhf (Reducing Decompensation Events Utilizing Intracardiac Pressures in Patients With Chronic Heart Failure) trial. They reported a positive association between daily median estimated pulmonary artery pressures and risk for ventricular tachycardia/ventricular fibrillation. Mechanical factors have also been implicated in arrhythmias in the long QT syndrome.<sup>6</sup>

In this issue of *Heart Rhythm*, Quintanilla and colleagues<sup>7</sup> used a sophisticated porcine model to address the question of whether or not increased intravascular pressures are as deleterious as the unstable electrical substrate in predisposing patients with heart failure (HF) to sustained reentrant arrhythmias. The experimental paradigm involved induction of electrophysiologic remodeling in HF (HF-ER). HF-ER was induced by high-rate ventricular pacing at 190 beats/min for approximately 7 weeks until clear signs of significant HF were evident. Transthoracic echocardiographic assessment was performed immediately before pacemaker implantation, shortly after the pacemaker was deactivated, and before the heart was prepared for study in an isolated Langendorff-perfused preparation. Programmed ventricular stimulation was studied under low and increased intraventricular pressure (IVP). Epicardial optical mapping was used to assess conduction velocity (CV), action potential duration (APD), and dispersion of repolarization (DoR). The authors hypothesized that elevated IVP or ionic imbalances, a catecholamine-rich milieu, could contribute equally to HF-ER in generating a substrate for reentry in atrial fibrillation. Accordingly, the authors studied the relative weight of 3 critical factors potentially involved in generating the unstable substrate favoring reentry in HF. A strong merit of this study is that these 3 proarrhythmic factors were studied concurrently in the same preparation in an extensive manner with appropriate controls.

The authors found with respect to increase in DoR, decreases in CV, and abbreviation of APD, that an increase

**Address reprint requests and correspondence:** Richard L. Verrier, PhD, FHRS, Associate Professor of Medicine, Harvard Medical School, Beth Israel Deaconess Medical Center, Division of Cardiovascular Medicine, Harvard-Thorndike Electrophysiology Institute, 99 Brookline Ave, RN-301, Boston MA 02215-3908. E-mail address: rverrier@bidmc.harvard.edu.



in IVP was nearly equivalent to changes in electrophysiologic remodeling in enhancing the substrate for sustained reentry in their model. Furthermore, they found that raising IVP was equal to HF-ER in increasing the odds of inducing sustained ventricular arrhythmias, which were >6-fold in either case in their model. The relative equivalency of IVP and HF-ER is particularly important notwithstanding the fact that the underlying ionic mechanisms between these 2 factors differ in many respects. This differentiation finds precedent in analogous factors at the tissue level, including augmented DoR, decreased CV, and wavelength. The change in the adrenergic/acidified milieu affected APD only slightly and resulted in predisposition to arrhythmia to a much lesser extent.

With respect to specific mechanisms for electrophysiologic remodeling in the current preparation, the underlying changes included a significant increase in APD, an increase in DoR of epicardial APD, and enhancement of repolarization gradients. The activation component of remodeling was reflected in considerably slower CV, which is linked to reentry, whether anatomically or functionally based, and is consistent with other experimental studies of rapid-pacing models, as well as in failing human hearts. These changes are probably attributable to alterations in connexin43 expression, which is known to be anisotropically reduced in atrial fibrillation.

The mechanisms whereby increased IVP conduces to sustained reentrant arrhythmias are similarly complex. IVP diminished CV, but to a lesser degree than did HF-ER. The reduction in CV associated with increased IVP did not appear to be attributable to stretch-activated ion-channel changes or altered resting membrane potentials but instead to an increase in intercellular resistance. The present study demonstrated changes in refractoriness that were comparable to experimental studies involving acute stretch.

As with most experimental models, there are limitations in extrapolating results to the human disease condition, in which arrhythmogenic factors are even more complex. The rapid-pacing model departs from human HF because tachycardia/myopathy does not promote significant fibrosis. The isolated heart also is devoid of a pericardium, and therefore, the degree of stretch may be more extensive than in clinical conditions wherein the pericardium limits overdistension. Use of a denervated preparation also precludes assessment of the involvement of central nervous system coordinating centers that likely participate in the pathogenesis of HF. Importantly, the humoral changes in congestive HF, particularly catecholamines,

which are known to alter automaticity and conduce to after-depolarizations, are not incorporated in the present model. The absence of this element in their experimental model could contribute to an underestimation of the role of neural factors in promoting a substrate for reentry.

Notwithstanding these limitations, the present study makes an important contribution to our understanding of the arrhythmogenic mechanisms in HF. The insights provided also shed light on the bases for the protective effect of nontraditional antiarrhythmic therapies. As the authors appropriately indicate, agents such as angiotensin-converting enzyme inhibitors and aldosterone antagonists can influence biochemical and neurochemical processes to maintain adequate filling pressures, which consequently can reduce risk for sudden cardiac death in patients with HF.<sup>8</sup>

Dr. Quintanilla and colleagues<sup>7</sup> are to be commended for drawing due attention to the importance of IVPs as a critical factor in arrhythmias in HF and have helped to bridge the gap between the mechanical and electrical conceptualizations of pathophysiology in HF. Ultimately, cross talk between “the trades” can enrich our appreciation of nature’s blueprint of the heart as a magnificent mechanoelectrical pump capable of beating more than 2 billion times in the lifetime of a healthy human.

## References

1. Kölliker A, Mueller H. Nachweis der negativen Schwankung des Muskelstromes am natürlich sich contrahirenden Muskel. *Verh Phys Med Ges* 1856;6:528–533.
2. Boyden PA, Ter Keurs HEDJ. Reverse excitation-contraction coupling: Ca<sup>2+</sup> ions as initiators of arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;12:382–385.
3. Zabel M, Portnoy S, Franz MR. Effect of sustained load on dispersion of ventricular repolarization and conduction time in the isolated intact rabbit heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996;7:9–16.
4. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW, Andrews ML, for the Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial II Investigators. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N Engl J Med* 2002;346:877–883.
5. Reiter MJ, Stromberg KD, Whitman TA, Adamson PB, Benditt DG, Gold MR. Influence of intracardiac pressure on spontaneous ventricular arrhythmias in patients with systolic heart failure: insights from the REDUCEhf trial. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;6:272–278.
6. De Ferrari GM, Schwartz PJ. Long QT syndrome, a purely electrical disease? Not anymore. *Eur Heart J* 2009;30:253–255.
7. Quintanilla JG, Moreno J, Archondo T, Usandizaga E, Molina-Morúa R, Rodríguez-Bobada C, González P, García-Torrent MJ, Filgueiras-Rama D, Pérez-Castellano N, Macaya C, Pérez-Villacastín J. Increased intraventricular pressures are as harmful as the electrophysiological substrate of heart failure in favoring sustained reentry in the swine heart. *Heart Rhythm* 2015;12:2172–2183.
8. Lane RE, Cowie MR, Chow AW. Prediction and prevention of sudden cardiac death in heart failure. *Heart* 2005;91:674–680.





# And the beat goes on . . . the beat goes on: organization and quasi-periodicity in ventricular fibrillation

José Jalife\*

Center for Arrhythmia Research, University of Michigan, 2800 Plymouth Road, Ann Arbor, MI 48109, USA

**This editorial refers to ‘K<sub>ATP</sub> channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation’ by J.G. Quintanilla et al., pp. 576–585, this issue.**

Ventricular fibrillation (VF) is a remarkably complex and seemingly disorganized cardiac excitation, in which propagating electrical waves fail dismally to activate the ventricles synchronously, with the consequent loss of contractile function. Despite its declining incidence, VF is still a major cause of sudden cardiac death in industrialized nations, which accounts for nearly 300 000 annual fatalities in the USA alone.<sup>1,2</sup> Clinically, VF can be observed on the electrocardiogram (ECG) as the sudden transition from the highly ordered and rhythmic pattern generated by sinuatrial activation into an irregular and aperiodic pattern, with undulating and variable morphology of the QRS complex.

Traditionally, the highly aperiodic and irregular ECG traces associated with VF have been thought to be the result of a totally random excitation of the ventricles.<sup>3,4</sup> However, over the last 20 years,<sup>5</sup> numerous advances in high-resolution spatiotemporal imaging, computer simulations, molecular, and genetic techniques have led to the gradual emergence of a new concept of VF, which turns out to be much more organized than the ECG would first suggest.<sup>6,7</sup> Such new advances have allowed investigation into the dynamics of fibrillatory behaviour and, just as important, the mechanisms underlying such dynamics in the structurally normal heart. Our technology has progressed to the point where we can now integrate multiple levels of organization, from the molecule to the organ level, as an aid to generate a cohesive understanding of the mechanisms that underlie the generation and maintenance of VF even in the structurally abnormal, diseased heart. With such efforts, we might be able to improve patient outcomes through the development of better designed and targeted treatments, as well as preventative measures for VF, in the foreseeable future.

The article by Quintanilla et al.<sup>8</sup> published in this issue of *Cardiovascular Research* provides yet another piece of evidence for the remarkable degree of organization that can be demonstrated in the fibrillating heart of a large mammalian species. It reports very significant new information about the manner in which pharmacological activation of inward rectifier potassium channels, particularly  $I_{KATP}$  channels, modify the

dynamics of rotors controlling VF. Understanding such dynamics is obviously important. In addition, establishing whether the arrhythmia is maintained by a dominant ‘leading rotor’, or by multiple wavelets, or even multiple coexisting rotors might provide further insight into therapy. The authors have carried out high-resolution optical mapping and an extensive analysis of some properties of rotors in the structurally normal swine ventricle, in the presence of cromakalim, a K-ATP channel opener.<sup>9</sup> They started by addressing the question of whether pharmacological activation of  $I_{KATP}$  increased the frequency of VF by generating one or more leading rotors and then if the acceleration of VF was accompanied by the unveiling of a high degree of organization that depended on specific rotor dynamics.

During VF, the behaviour of rotors can vary over a wide spectrum.<sup>5,6,10</sup> They may be very unstable and short lived, they may meander within limited expanses, or they may be remarkably stable, long lasting and result in a high degree of spatial and temporal organization in their immediate surroundings, depending on the ionic and molecular substrate in which they ensue. Previous studies in small mammals and in computer simulations have demonstrated that inward rectifier channels, particularly Kir2.1 channels, can strongly regulate rotor behaviour.<sup>10,11</sup> For example, in the guinea pig heart, the density of  $I_{K1}$  is significantly larger in myocytes obtained from the left ventricle (LV) than the right ventricle (RV), which results in a substantial gradient of action potential duration (APD) and the stabilization of a single, long-lasting ‘mother rotor’ in the LV during VF.<sup>10</sup> The spiral wave activity generated by such a highly stable rotor causes turbulence and fibrillatory conduction in its periphery. Consequently, in the guinea pig heart, the frequency of fibrillatory activity of the LV is substantially higher than the RV.<sup>10</sup> Subsequent incorporation of the  $I_{K1}$  gradient between LV and RV into a computer-based ionic model of the cardiac ventricular myocytes reproduced a stable rotor with a spinning frequency of 35 Hz in the region with larger  $I_{K1}$ .<sup>10</sup> Fibrillatory conduction characterized the region of the model with right ventricular  $I_{K1}$ . Further experimentation showed that perfusion with Ba<sup>2+</sup> at a relatively low concentration that selectively blocked  $I_{K1}$  resulted in a dose-dependent decrease in the frequency of the rotor, slightly higher Ba<sup>2+</sup> concentrations terminated VF.<sup>12</sup>

More recently, it was shown that cardiac specific up-regulation of  $I_{K1}$  in the heart of a transgenic mouse overexpressing Kir2.1 channels

accelerated the final phase of action potential repolarization, which significantly shortened the APD and the QT interval.<sup>11,13</sup> During VF, this translated into faster and more stable rotors because of shortening of wavelength and relative membrane hyperpolarization, both of which contributed to greater  $\text{Na}^+$  channel availability during the excitable gap and thus to increased excitability ahead of the rotating wave front.<sup>11</sup> In addition,  $I_{K1}$  overexpression augmented the voltage gradient established between resting cells in the centre of rotation and the active cells in its immediate surroundings. These effects helped to enhance the electrotonic currents that flowed continuously between resting and active cells, which further contributed not only to hasten the repolarization of the active cells, but also to reduce the propagation velocity very near the core. The end result was a steeper rise in the local CV as a function of the distance from the core and a faster, more stable rotor in transgenic, compared with the wild-type hearts.<sup>11,14</sup> Further, during re-entry in the  $I_{K1}$  overexpressing hearts, the unexcited cells at the very centre of the core provided a larger than normal outwards conductance which decreased the likelihood of being excited by the depolarizing influence of their immediate, actively depolarized neighbours (sink-to-source mismatch), helping to reduce core size and meandering and to stabilize the rotor.

Recent studies,<sup>15–17</sup> suggest that even in large hearts such as that of the pig or the human, the dynamics of wave propagation during VF are not as complex as might occur if the mechanism were spiral breakup, or as random as would be expected from the multiple wavelet hypothesis. In fact, Rogers *et al.*<sup>15</sup> were unable to rule out the possibility that mother rotors located in unmapped regions in their swine heart experiments maintained the fibrillatory activity. Additionally, it has been proposed that the mother rotor and the multiple wavelets are both mechanisms of VF in the human heart.<sup>17,18</sup> Yet another study, in which the epicardium of the human LV was mapped concluded that there is significant organization of human VF and that such organization requires the presence of rotors.<sup>17</sup>

In the study of Quintanilla *et al.*<sup>8</sup> cromakalim-induced opening of another inward rectifier channel (in this case K-ATP) in the much larger swine heart promoted the formation and stabilization of rotors whose cores were remarkably smaller than in control, which contributed to their stabilization and to make the rotors undergo hundreds to thousands of rotations. The basis for such rotor acceleration is likely to be qualitatively similar to that demonstrated for  $I_{K1}$  up-regulation in the mouse heart.<sup>11</sup> As expected greatly accelerated rotors were surrounded by areas of very rapid activation, with domains of high spectral organization surrounded by very poorly organized areas, most likely the result of wavebreaks and fibrillatory conduction. The spectral domains of highest organization coincided with the location of persistent, long-lasting rotors that generated beautiful spiral waves with one or more full windings. In addition, in some VF episodes, Quintanilla *et al.*<sup>8</sup> demonstrate that several persistent rotors (up to 4) may concur in a small region, activate at the same frequency and complete hundreds of rotations side by side, but without seemingly interacting with each other. Such a remarkable behaviour is likely the result of the fact that, by significantly augmenting the potassium current density in the outsized pig ventricles, K-ATP-channel opening considerably increased the ratio between the tissue size and the core size. This, together with the  $I_{KATP}$  induced reduction of refractoriness, enabled more 'elbow room' for multiple rotors to coexist and mutually synchronize at a high frequency and with a high degree of organization.

Another interesting observation reported by Quintanilla *et al.*<sup>8</sup> in the setting of  $I_{KATP}$  channel opening is that rotors that do not remain rigidly

rotating may appear repetitively in rapid succession at specific locations, drift rapidly through the ventricles and then disappear, giving rise to an interesting quasi-periodic waxing and waning, which they describe as a 'beat phenomenon' in the optical action potential amplitude. Beat phenomena are well known in many other physical oscillatory systems when two frequencies are close together. For example, in acoustics, a beat occurs when there is interference between two pure tones with slightly different frequencies. The superposition of the two results in an *amplitude modulation* of the superposed wave. It is perceived as periodic variations in sound volume whose rate is determined by the difference between the two frequencies. In the context of accelerated VF, Quintanilla *et al.*<sup>8</sup> explain it as the 'consecutive approaches and withdrawals of the cores of successive rotors drifting across the border between two frequency domains'. They argue convincingly that the only way to explain the highly deterministic beat phenomenon associated with VF in their swine heart preparations is on the basis of the Doppler equations that relate the rotation frequency of the rotor to the speed of its spatial drift and the wave speed.<sup>19</sup>

Finally, in an effort to provide additional clinical relevance to their study, they generated offline pseudo-bipolar electrograms to evaluate whether transvenous catheters used in the clinical laboratory to record cardiac electrical activity could help the operator in localizing high-frequency sources of fibrillation and to determine whether so-called fractionated electrograms actually correspond to the location of such sources. They demonstrate persuasively that the pseudo-electrograms recorded at the locus of the rotor are highly organized and that complex fractionation does not occur near rotor activity.

Altogether, the results of Quintanilla *et al.*<sup>8</sup> have increased our understanding of the manner in which potassium channels, particularly K-ATP channels, control rotor dynamics. In addition, they provide further support to the hypothesis that VF is driven by a small number of rotors. They also represent a good start to focus on mechanistic insights regarding the role of K-ATP channels in VF, particularly in the context of global ischaemia, which is confounded by the presence of multiple variables such as high  $\text{K}^+$ , low pH, etc. Moreover, as recently demonstrated for the guinea pig heart, global ischaemia-induced  $I_{KATP}$  activation contributes to LV-RV heterogeneity in anterior subepicardial APD, in part due to the higher density of  $I_{KATP}$ , as well as higher Kir6.1/Kir6.2 mRNA levels in the LV compared with RV.<sup>20</sup> Further, transmural differences in K-ATP channels might also influence VF dynamics and quasi-periodic rotor behaviour, not only in the ischaemic myocardium,<sup>21</sup> but also other substrates such as in Brugada syndrome and the J wave syndrome,<sup>22,23</sup> where genetic defects may cause the activation of the K-ATP channels.<sup>24</sup> Clearly, the relative importance of  $I_{KATP}$  gradients between LV and RV and between the epicardium and the endocardium in determining or modulating the interesting rotor behaviours reported by Quintanilla *et al.*<sup>8</sup> requires further systematic investigation. Nevertheless, their demonstration of such a high degree of spatial and temporal organization in fibrillatory dynamics in a mammalian species whose heart size is similar to the human heart, under conditions that promote rotor stability and longevity, is an important new step towards better understanding this highly lethal and remarkably complex cardiac rhythm alteration that we call VF.

## References

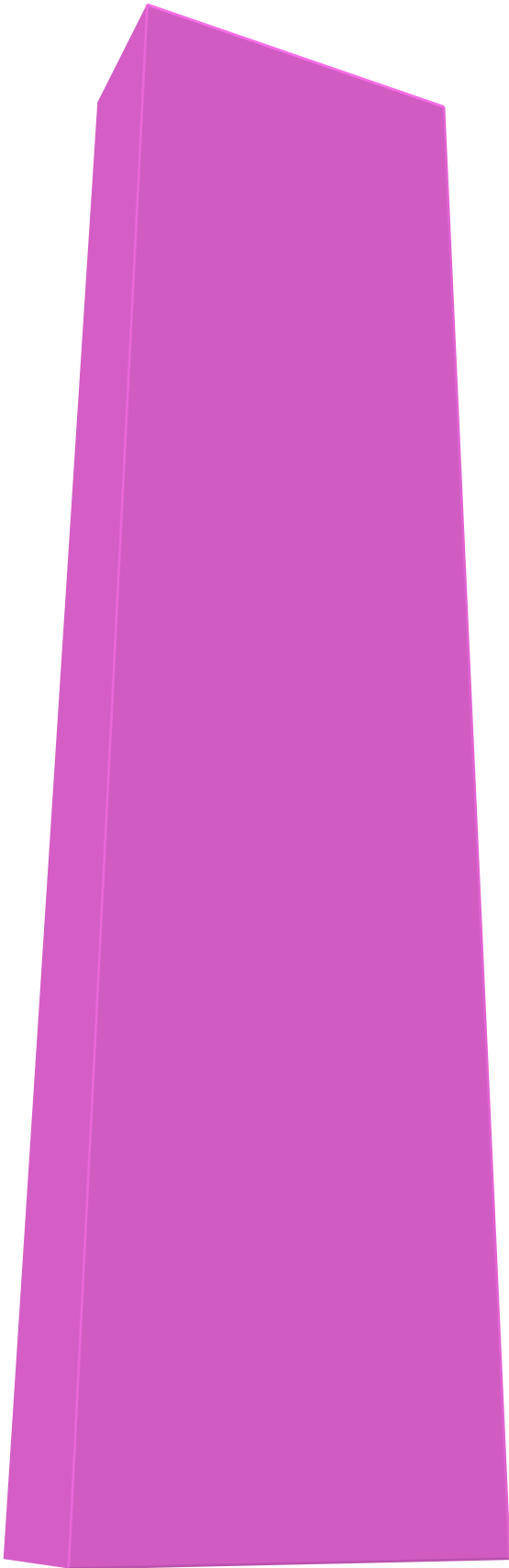
- Myerburg RJ, Spooner PM. Opportunities for sudden death prevention: directions for new clinical and basic research. *Cardiovasc Res* 2001;**50**:177–185.
- Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. *Circulation* 1998;**98**:2334–2351.
- Jalife J. Ventricular fibrillation: mechanisms of initiation and maintenance. *Annu Rev Physiol* 2000;**62**:25–50.

4. Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J* 1964;**67**:200–220.
5. Davidenko JM, Pertsov AV, Salomonsz R, Baxter WW, Jalife J. Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle. *Nature* 1992;**355**:349–351.
6. Jalife J, Gray RA, Morley GE, Davidenko JM. Self-organization and the dynamical nature of ventricular fibrillation. *Chaos* 1998;**8**:79–93.
7. Jalife J, Berenfeld O, Skanes A, Mandapati R. Mechanisms of atrial fibrillation: mother rotors or multiple daughter wavelets, or both? *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;**9**:S2–12.
8. Quintanilla J, Moreno J, Archondo T, Chin A, Pérez-Castellano N, Usandizaga E *et al*.  $K_{ATP}$  channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res* 2013;**99**:576–585.
9. Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate atp-sensitive  $k^+$  channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989;**245**:177–180.
10. Samie FH, Berenfeld O, Anumonwo J, Mironov SF, Udassi S, Beaumont J *et al*. Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation. *Circ Res* 2001;**89**:1216–1223.
11. Noujaim SF, Pandit SV, Berenfeld O, Vikstrom K, Cerrone M, Mironov S *et al*. Up-regulation of the inward rectifier  $k^+$  current ( $i_{k1}$ ) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol* 2007;**578**:315–326.
12. Warren M, Guha PK, Berenfeld O, Zaitsev A, Anumonwo JM, Dhamoon AS *et al*. Blockade of the inward rectifying potassium current terminates ventricular fibrillation in the guinea pig heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;**14**:621–631.
13. Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic up-regulation of  $ik1$  in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**287**:H2790–H2802.
14. Vaquero M, Calvo D, Jalife J. Cardiac fibrillation: from ion channels to rotors in the human heart. *Heart Rhythm* 2008;**5**:872–879.
15. Rogers JM, Huang J, Melnick SB, Ideker RE. Sustained reentry in the left ventricle of fibrillating pig hearts. *Circ Res* 2003;**92**:539–545.
16. Huang J, Rogers JM, Killingsworth CR, Singh KP, Smith WM, Ideker RE. Evolution of activation patterns during long-duration ventricular fibrillation in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**286**:H1193–H1200.
17. Nanthakumar K, Walcott GP, Melnick S, Rogers JM, Kay MW, Smith WM *et al*. Epicardial organization of human ventricular fibrillation. *Heart Rhythm* 2004;**1**:14–23.
18. Nash MP, Mourad A, Clayton RH, Sutton PM, Bradley CP, Hayward M *et al*. Evidence for multiple mechanisms in human ventricular fibrillation. *Circulation* 2006;**114**:536–542.
19. Jalife J, Gray R. Drifting vortices of electrical waves underlie ventricular fibrillation in the rabbit heart. *Acta Physiol Scand* 1996;**157**:123–131.
20. Pandit SV, Kaur K, Zlochiver S, Noujaim SF, Furspan P, Mironov S *et al*. Left-to-right ventricular differences in  $i(katp)$  underlie epicardial repolarization gradient during global ischemia. *Heart Rhythm* 2011;**8**:1732–1739.
21. Antzelevitch C. Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndromes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**293**:H2024–H2038.
22. Yan GX, Antzelevitch C. Cellular basis for the brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation* 1999;**100**:1660–1666.
23. Antzelevitch C, Yan GX. J wave syndromes. *Heart Rhythm* 2010;**7**:549–558.
24. Medeiros-Domingo A, Tan BH, Crotti L, Tester DJ, Eckhardt L, Cuoretti A *et al*. Gain-of-function mutation s422 l in the KCNJ8-encoded cardiac  $k(ATP)$  channel  $kir6.1$  as a pathogenic substrate for J-wave syndromes. *Heart Rhythm* 2010;**7**:1466–1471.



## Apéndice B

### **Otras aportaciones con contribución relevante del doctorando**







# Morphological and Thermodynamic Comparison of the Lesions Created by 4 Open-Irrigated Catheters in 2 Experimental Models

JAVIER MORENO, M.D., PH.D.,<sup>\*,†</sup> JORGE G. QUINTANILLA, M.S.ENG.,<sup>\*,‡</sup>  
 ROBERTO MOLINA-MORÚA, M.S.ENG.,<sup>\*</sup> MARÍA JESÚS GARCÍA-TORRENT, PH.D.,<sup>\*</sup>  
 MARÍA JOSÉ ANGULO-HERNÁNDEZ, B.S.,<sup>§</sup> CAROLINA CURIEL-LLAMAZARES, M.S.ENG.,<sup>\*</sup>  
 JULIO RAMIRO-BARGUEÑO, M.S.ENG., PH.D.,<sup>§</sup> PABLO GONZÁLEZ, V.M.D.,<sup>\*</sup>  
 ANTONIO J. CAAMAÑO, M.S.ENG., PH.D.,<sup>§</sup> NICASIO PÉREZ-CASTELLANO, M.D., PH.D.,<sup>\*</sup>  
 JOSÉ LUIS ROJO-ÁLVAREZ, M.S.ENG., PH.D.,<sup>§</sup> CARLOS MACAYA, M.D., PH.D.,<sup>\*</sup> and  
 JULIÁN PÉREZ-VILLACASTÍN, M.D., PH.D.<sup>\*</sup>

From the <sup>\*</sup>Optical and Thermal Mapping Laboratory, Arrhythmia Unit, Cardiovascular Institute, IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain; <sup>†</sup>Arrhythmia Unit, Cardiology Department, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; <sup>‡</sup>Advanced Development in Arrhythmia Mechanisms and Therapy Laboratory, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, Spain; and <sup>§</sup>Department of Electrical and Computer Engineering, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, Spain

**Thermodynamic Evaluation of 4 Open-Irrigated Catheters.** *Introduction:* New generation open-irrigated catheters aim to improve irrigation efficiency. This may change lesion patterns, challenging operators. Indeed, safety issues have recently arisen. We aimed to experimentally assess 4 open-irrigated catheters, comparing lesion size, safety, and heat transfer.

*Methods:* The thigh lesion model was employed in 6 anesthetized pigs to assess the morphology of perpendicular and tangential lesions (n = 140) created by the newer catheters ThermoCool<sup>®</sup> SF, CoolFlex<sup>™</sup>, and Blazer<sup>™</sup> Open-Irrigated, and the standard ThermoCool<sup>®</sup>, at a constant power of 30 W (60 seconds). To evaluate the propensity for deep-tissue overheating, a set of 120 applications were performed at 50 W (180 seconds) comparing pop rates. Thermal assessment of the lesion generation process (20 W, 60 seconds, n = 32) was performed with an infrared camera on bovine ventricular tissue.

*Results:* At 30 W, the newer catheters showed lower temperature readings compared with the ThermoCool<sup>®</sup>. No major efficacy or safety differences were found at tangential applications; however, at perpendicular applications: (1) the SF at 17 mL/min better preserved the superficial layers and focused its maximum thermal effect deeper, but at recommended flow rates (8 mL/min) it generated the largest superficial lesions; (2) CoolFlex<sup>™</sup> created smaller lesions than SF and readily induced steam pops at 50 W without temperature control; and (3) no major differences were found comparing Blazer<sup>™</sup> Open-Irrigated and ThermoCool<sup>®</sup>.

*Conclusions:* The lower temperature readings in the newer catheters make them more prone to deliver the maximum programmed power. Under experimental conditions, the SF catheter focuses its maximum effect deeper and the CoolFlex<sup>™</sup> can be more prone to induce steam pops at high power settings.

(*J Cardiovasc Electrophysiol*, Vol. pp. 1-9)

*arrhythmia, catheter ablation, lesion, radiofrequency, ventricular tachycardia*

## Introduction

The purpose of this study was to independently evaluate, in an experimental lesion model and under controlled conditions, the performance of 3 of the latest open irrigated catheters available on the market (Boston Scientific Blazer<sup>™</sup> Open-Irrigated [Boston Scientific, Marlborough, MA, USA], Biosense ThermoCool<sup>®</sup> SF [Biosense Webster, Diamond Bar, CA, USA], and St. Jude CoolFlex<sup>®</sup> [St. Paul, MN, USA]), comparing them with a standard irrigation catheter

J. Moreno and J.G. Quintanilla contributed equally to this paper.

This study was supported by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), European Union, and Instituto de Salud Carlos III, Spain (RD12/0042/0036 [RIC], RD06/0003/0009 [REDINSOR]).

Javier Moreno received teaching honoraria from Biosense Webster, St. Jude Medical, and Boston Scientific. Roberto Molina-Morúa received an academic grant from Boston Scientific during the experimental phase. Julián Pérez-Villacastín received compensation for participation on a speaker's bureau from Bayer, BMS, Boehringer Ingelheim, Servier, Esteve, Pfizer, Astra-Zeneca, Sanofi Aventis, Almirall, Menarini, MSD, Johnson & Johnson, St. Jude Medical, Bard, Boston Scientific, Medtronic, and Sorin; he has served as advisor/consultant to these companies. Other authors: No disclosures.

Address for correspondence: Javier Moreno, M.D., Ph.D./Jorge G. Quintanilla, M.S.Eng., Hospital Clínico San Carlos, C/Professor Martín

Lagos S/N, CP 28040, Madrid, Spain. Fax: +34-91-330-3527; E-mail: jmoreno@secardiologia.es; jgarciaqui.hcsc@salud.madrid.org

Manuscript received 13 June 2014; Revised manuscript received 6 August 2014; Accepted for publication 7 August 2014.

doi: 10.1111/jce.12528

**TABLE 1**  
Technical Features and Recommended Parameters

	BW ThermoCool®	SJM CoolFlex™	BSc Blazer™ OI	BW ThermoCool® SF
# Fluid Ports	6	Porous tip†	6	56
Tip Electrode Length (mm)	3.5	4	4	3.5
Tip Electrode Diameter (F)	7.5	7	7.5	7.5
Max. Temperature (°C)	50	45	50	40
Max. Time at 1 Location (seconds)	120	60	60	120
Max. Power (W)				
Perpendicular	35	50‡	50	35 (50 for VT)
Tangential	50	50‡	50	50
Irrigation Flow Rate (mL/min)				
≤30 W	17	10-17§	17	8
31-50 W	30	10-17§	30	15

BW = Biosense Webster; SJM = St. Jude Medical; BSc = Boston Scientific; SF = Surround Flow.

†Four open holes at distal tip and multiple laser cut lateral slits.

‡There is a possibility of higher incidences of steam pops at power levels exceeding 40 W and increased collateral damage when maximum power settings (50 W) are used. Power should be increased to these levels only if lower energies do not achieve the intended result.

§17 mL/min were used to obtain preclinical data (ref. 18).

(Biosense ThermoCool®, Biosense Webster), focusing on lesion size, safety, and tissue temperatures. This evaluation may help the operator to properly adjust the ablation settings and irrigation flows to these new-design catheters.

One of these catheters (Biosense ThermoCool® SF) has been associated, in a single-center communication, with a higher rate of perforations and extracardiac damage, ablating atrial tissue in patients.<sup>1</sup> However, 2 clinical studies on atrial fibrillation did not report safety issues,<sup>2,3</sup> so controversy has arisen.<sup>4</sup> In this regard, the manufacturer has recently released an urgent safety notice to warn about a 5- to 14-fold increased rate of adverse events with the SF catheter as compared with the standard ThermoCool®.<sup>5</sup> These widely different results demonstrate the need for further experimental studies to assess the optimal settings for a better efficacy and safety profile.<sup>3,4</sup> We hypothesize that if the ThermoCool® SF catheter is more prone to perforations and extracardiac damage, its heat transfer pattern should be different to the others.

## Methods

This study was locally reviewed and approved in accordance with European guidelines (2010/63/EU) for the care of laboratory animals. Six female adult Pietrain pigs (50-70 kg) were selected. Animals were premedicated with ketamine (20 mg/kg, im) and surgeries were performed under general anesthesia (propofol 6 mg/kg, atracurium besylate 0.2 mg/kg, and 1.25 mg/kg/h, fentanyl 0.005 mg/kg/h, isoflurane 2%).

## Catheters

Four different open irrigated catheters were tested: (1) ThermoCool® SF (Biosense-Webster); (2) Blazer™ Open-Irrigated (Boston Scientific); (3) Therapy™ Cool Flex™ (St. Jude Medical); and (4) ThermoCool® (Biosense-Webster), as a standard irrigation catheter. Technical features of the catheters and the parameters recommended by their manufacturers<sup>6-9</sup> are summarized in Table 1.

All catheters were irrigated with heparinized (1,000 U/L) saline solution (~23 °C) using a CoolFlow® irrigation pump (Biosense-Webster). An EP Shuttle (Stockert GmbH, Germany) radiofrequency (RF) generator was used with all catheters. It was connected to a laptop computer to digi-

tally register impedance, temperature, voltage, current, and power data (EPWIN 5.011 software).

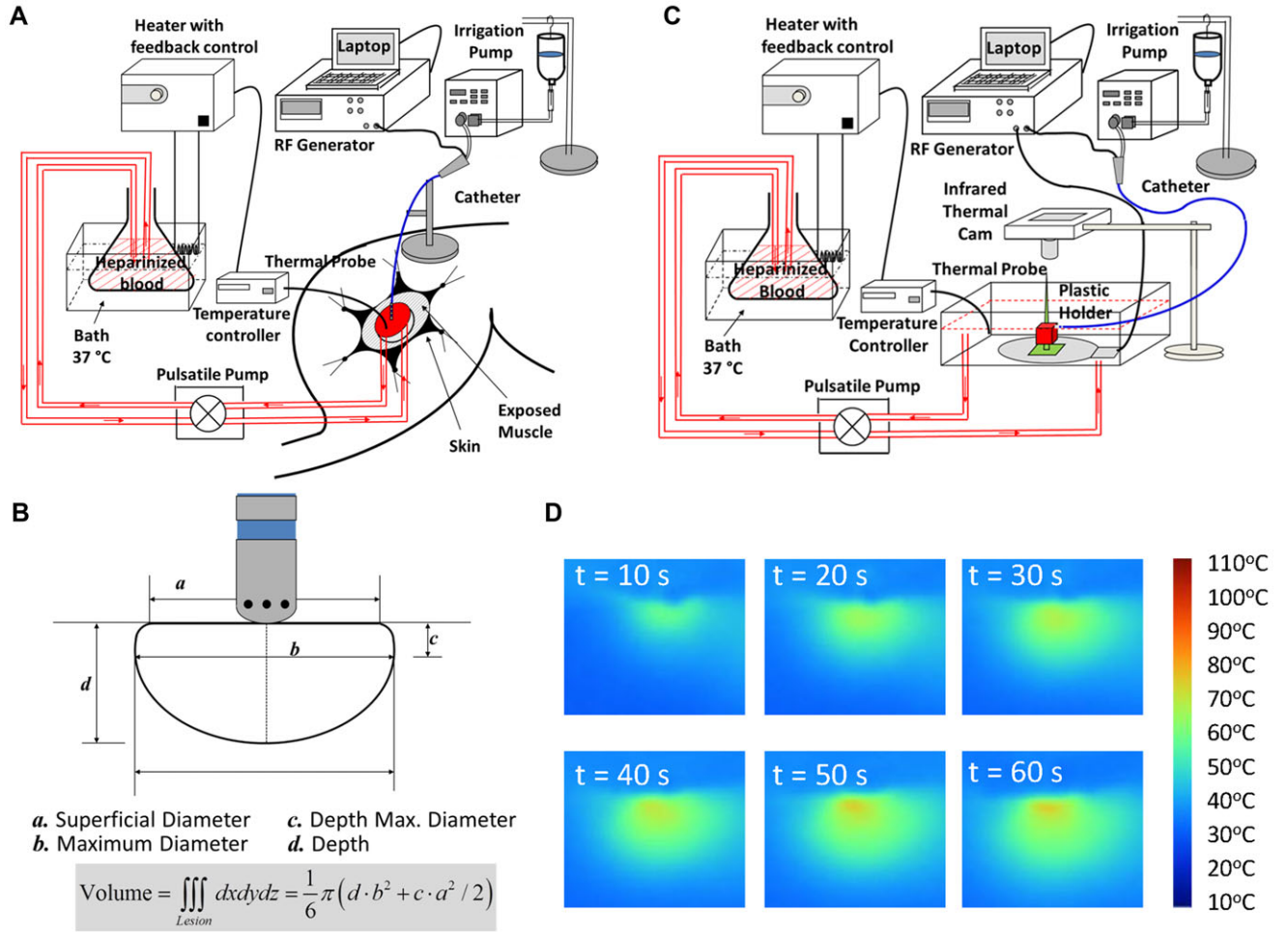
## Experimental Setup

Under general anesthesia, a 20-cm skin incision was performed in one of the thighs. After exposing the muscle, a cradle was created (Fig. 1A). Approximately 800 cc of arterial blood was collected into a flask with 5,000 heparin units and replaced with 800 cc of saline. The flask was then placed in a water bath at 38 °C. Activated clotting time (ACT) of this blood pool was periodically checked and additional heparin was used as required to maintain an ACT > 300 seconds throughout the experiment. The cradle was filled with the blood using a pump (Masterflex, Cole Palmer Inc., USA) with a peak flow velocity of 0.2 m/s. The inlet tube was positioned 1.5 cm from the ablation sites and an additional outlet tube suctioned the blood away creating a closed loop at a constant blood flow at the electrode tip-tissue interface, simulating a medium local blood flow at the ablation site as described elsewhere.<sup>10</sup> Temperature was digitally controlled (Digi-sense Temperature Controller, Cole Palmer, USA) with a probe inside the cradle to maintain a constant temperature of 38 °C.

## Ablation Protocol

Morphological evaluation of lesions was performed in a set of 30 W RF applications. A second set of lesions was conducted at 50 W to evaluate the incidence of steam pops. Applications were delivered at a constant weight of 10 g,<sup>11</sup> as previously adjusted by an external certified digital balance (Adventurer, USA). The RF generator was programmed in power-controlled mode, clearing all impedance, and temperature-controlled cut-off settings. After each RF application, the cradle was drained looking for thrombus or charring and the electrode was positioned at a new site.<sup>12</sup>

In the first phase, applications were performed at 30 W for 60 seconds, and irrigation flow was set to 17 mL/min. Programmed power was fully delivered from the beginning of the application. The sequence of catheters and orientations was randomized. For every tested catheter in every animal, a minimum of 2 applications were performed perpendicular and



**Figure 1.** A: Schematic representation of the swine thigh muscle preparation. B: Diagram of the lesion measurements. The perpendicular dotted line marks the line used to track temperatures in the infrared experiments (0-12 mm). C: Schematic representation of the ventricular bovine cardiac tissue preparation for infrared imaging. D: Example of the thermodynamic evolution of a lesion. Thermal images were obtained every 10 seconds.

2 tangential to the tissue. Following the manufacturer's recommendations for the SF catheter, an extra round of applications was performed with an 8 mL/min irrigation flow. Thus, at least 20 lesions were created in each 30 W experiment. In order to increase the number of lesions evaluated without sacrificing more animals, in some experiments, additional applications with random catheters and positions were conducted without compromising previous applications. Twenty out of the 140 lesions evaluated (14%) were obtained this way.

At completion, after covering the cradle, the other thigh was prepared as described above. The same ablation protocol was performed using 50 W and at 30 mL/min. Applications were delivered until a pop occurred, or up to 180 seconds. Steam pops were identified by an audible pop associated with an impedance increase. Time to pop was registered. An extra round of applications was performed with the SF catheter at 15 mL/min as recommended. Thus, 20 valid applications were performed in each 50 W experiment.

### Lesion Measurement

Upon completion of the experiment, the animal was euthanized (thiopental, 10 mg/kg iv) and the thigh muscle excised for analysis. The muscle was placed in 10% triphenyl

tetrazolium chloride (TTC) at 40 °C for 30 minutes. The tissue was fixed with 10% formalin and lesion measurements were performed 24 hours later. To diminish shrinking and lesion deformation, the muscle was placed in saline solution at least 15 minutes before lesions were measured. Lesions were cross-sectioned and the following dimensions were determined using a digital caliper: surface maximum diameter, maximum internal diameter, maximum depth, and depth of the maximal internal diameter.<sup>10,11,13-16</sup> Lesion volume was calculated by assuming the lesion shape was an oblate ellipsoid and subtracting the estimated volume extending above the surface of the tissue (Fig. 1B).<sup>10</sup> All lesion measurements were performed in a strictly blinded manner to catheter type and settings.

### Thermographic Evaluation

To track the heat transfer through the tissue during the applications, an infrared (IR) digital camera was used, with a temperature measurement range of -20 °C to +250 °C and a sensitivity of  $\leq 0.13$  °C at 30 °C and a 640 × 480 resolution (IR Ti-10, Fluke, USA). IR thermal cameras obtain heat information only at the surface plane, thus a second experimental model had to be used to obtain thermal images of the cross-section of the lesion. The model consisted of filming the

**TABLE 2**  
Electrical Parameters Registered During 30 W-60 sec Lesions

	BW ThermoCool® (17 mL/min)	SJM CoolFlex™ (17 mL/min)	BSc Blazer™ OI (17 mL/min)	BW SF-17 (17 mL/min)	BW SF-8 (8 mL/min)	Global P Value
<b>Perpendicular applications</b>						
# Lesions	12	15	15	13	12	
Voltage (V)	48.3 ± 2.6	47.0 ± 1.4	48.1 ± 1.7	48 ± 0.6	48.9 ± 0.6	n.s.
Current (mA)	619.4 ± 11.9	627.9 ± 12.4*	623.9 ± 8.3	616.8 ± 8.9*	618.9 ± 4.7	0.013
Power (W)	29.5 ± 0.4	29.5 ± 0.5	29.7 ± 0.3	29.7 ± 0.3	29.7 ± 0.3	n.s.
Impedance (Ω)						
– Initial	118.6 ± 23.0	117.3 ± 12.1	124.4 ± 16.6	118.3 ± 7.9	118.8 ± 6.9	n.s.
– Final	93.9 ± 18	89.5 ± 7.4	94.8 ± 11.6	93.9 ± 5.4	94.2 ± 2.8	n.s.
Tip Temperature (°C)						
– Mean	39.1 ± 2.6* •	36.8 ± 6.6†‡	33.4 ± 1.5* ‡	32.5 ± 1.1* ‡	34.4 ± 0.6	<0.001
– Maximum	42.1 ± 6* ‡	39.3 ± 6.8	36.9 ± 1.8*	36.5 ± 1.4†	38.0 ± 0.9	0.002
<b>Tangential applications</b>						
# Lesions	16	14	15	14	14	
Voltage (V)	47.8 ± 2.0	46.6 ± 1.0	47.3 ± 1.9	47.0 ± 1.2	48.9 ± 0.9	n.s.
Current (mA)	621.1 ± 5.9	629.3 ± 9.7	630.2 ± 11.5	621.9 ± 11.2	614.2 ± 4.8	0.02
Power (W)	29.7 ± 0.4	29.3 ± 0.4	29.6 ± 0.4	29.3 ± 0.4	29.8 ± 0.2	n.s.
Impedance (Ω)						
– Initial	115.4 ± 18.8	111.2 ± 15.2	115.6 ± 16	110.1 ± 9.6	115.2 ± 14.8	n.s.
– Final	92.2 ± 13.7	87.2 ± 7.5	92.3 ± 9.2	89.1 ± 5.5	94.1 ± 9.2	n.s.
Tip Temperature (°C)						
– Mean	44.6 ± 3.3* ‡ •	37.6 ± 5.4†‡	34.9 ± 2.0*	32.5 ± 0.9* ‡	35.4 ± 1.2	<0.001
– Maximum	46.6 ± 3.3†	40.3 ± 7.8	37.7 ± 1.3	36.5 ± 1.1	37.5 ± 1.2	<0.001

Values: Mean ± SD. Global P values from one-way ANOVA. Bonferroni correction for paired comparisons. P values < 0.1 are shown.

† Value significantly higher than all the other catheters.

\*, ‡, •, † Symbols represent significant differences (P < 0.05) between marked pair of catheters in the same category.

heat transfer of RF applications on a bovine ventricular myocardium slab ( $\sim 5 \times 5 \times 5 \text{ cm}^3$ ) immersed in a swine blood-pool with a constant heparinized blood flow (speed 0.2 m/s at  $\sim 37^\circ\text{C}$ ), as shown in Figure 1C. Applications were perpendicular to the endocardial surface, away from trabeculated muscles, such that the IR camera filmed the cross-section of the ablated area. To assure a similar electrode-tissue contact within the different catheters and applications, the catheter was gently advanced to the tissue until a sudden impedance increase indicated tissue-tip contact.<sup>17</sup> Due to the consistent presence of early steam pops at applications over 25 W or under low irrigation flows, all applications were performed at 20 W and 17 mL/min for 60 seconds. Eight perpendicular applications were conducted per catheter. Thermal images were acquired every 10 seconds of RF (Fig. 1D). Off-line image processing was performed using customized software, tracking local temperatures along an orthogonal line from the surface to a 12 mm depth.

### Statistical Analysis

Data are reported as mean ± SD, except in Figure 4 (mean ± SEM). Lesion size measurements, electrical parameters, and IR camera data comparisons between groups were tested using one-way ANOVA, with Bonferroni correction for paired comparisons. To compare time evolution to pop, Kaplan Meier survival plots were calculated and global and paired comparisons were performed (log-rank test). A P < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Morphologic Characterization of Lesions (30 W/60 s)

A total of 140 valid RF applications were delivered in both positions (tangential and perpendicular). Table 2 shows that a similar amount of RF power was delivered in all applications as a similar delivered averaged power was achieved. No coagulum formation or thrombus occurred in any application; however, audible steam pops were detected in 4 out of 140 applications (2.9%). Applying RF, no significant differences were found in the impedance values. Mean and maximum tip temperature readings were significantly lower with the Blazer™-OI and the SF catheter, at a standard flow (17 mL/min; SF-17), and the TC catheter showed the highest readings.

Table 3 and Figure 2 summarize the morphological evaluation of all 30 W lesions. Analyzing the perpendicular applications, we found that the SF catheter generated the widest (SF-8) and the narrowest (SF-17) lesions. The widest internal diameters tended to occur with the SF at all flow rates, and were significantly larger than those produced by the CoolFlex™ catheter. The location of these maximum diameters was slightly deeper for the SF-17 and the Blazer™ than the CoolFlex™. No major differences in the maximum depth of lesions were observed between catheters, although there was a trend for lower depth (P = 0.09) with the CoolFlex™ catheter compared with the SF-17 catheter. Finally, both SF groups of applications created larger volume lesions than the CoolFlex™. The CoolFlex™ catheter also showed a trend to smaller volume lesions compared with the BOI (P = 0.09), while the SF-17 tended to show larger volume lesions than the standard TC catheter (P = 0.08).



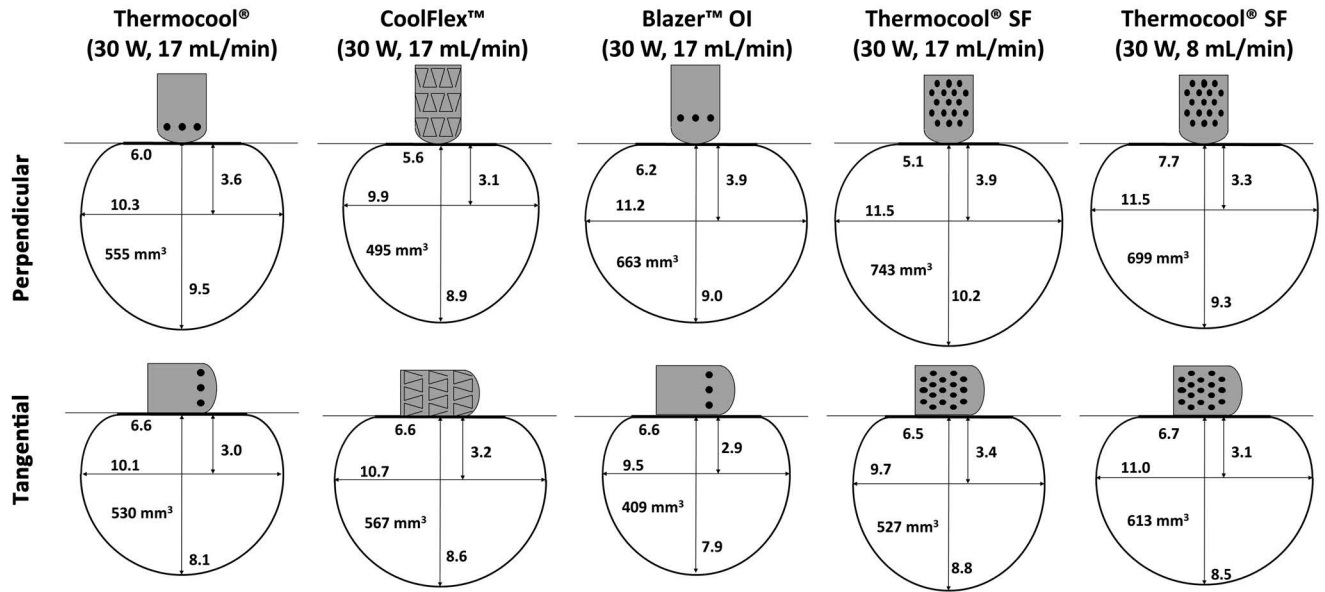
**TABLE 3**  
Lesion Morphological Characteristics (30 W, 60 seconds)

	30 W, 17 mL/min				30W, 8 mL/min	Global
	BW ThermoCool®	SJM CoolFlex™	BSc Blazer™ OI	BW SF-17	BW SF-8	P Value
Perpendicular						
# Lesions	12	15	15	13	12	
Superficial Diameter	6.0 ± 1.1	5.6 ± 1.0	6.2 ± 0.9*	5.1 ± 1.1*	7.7 ± 0.7 †	<0.001
Max. Diameter	10.3 ± 1.5	9.9 ± 1.8*‡	11.2 ± 1.4	11.5 ± 0.9*	11.5 ± 1.1‡	0.008
Depth Max. Diameter	3.6 ± 0.6	3.1 ± 0.5*‡	3.9 ± 1.0‡	3.9 ± 0.7*	3.3 ± 0.3	0.002
Depth	9.3 ± 1.4	8.9 ± 1.5	9.0 ± 1.2	10.2 ± 1.5	9.3 ± 0.9	n.s.
Volume	555 ± 151	495 ± 178‡*	663 ± 221	743 ± 164‡	699 ± 111*	0.002
Tangential						
# Lesions	16	14	15	14	14	
Superficial Diameter	6.6 ± 1.3	6.6 ± 0.9	6.6 ± 0.9	6.5 ± 1.1	6.7 ± 0.7	n.s.
Max. Diameter	10.1 ± 1.6	10.7 ± 1.3	9.5 ± 1.8	9.7 ± 2.0	11.0 ± 1.2	n.s.
Depth Max. Diameter	3.0 ± 0.8	3.2 ± 0.8	2.9 ± 0.6	3.4 ± 1.1	3.1 ± 0.3	n.s.
Depth	8.1 ± 1.8	8.6 ± 1.7	7.9 ± 1.6	8.8 ± 2.0	8.5 ± 1.4	n.s.
Volume	530 ± 128	567 ± 187	409 ± 111*	527 ± 133	613 ± 142*	0.01

Values: Mean ± SD. Data is expressed in mm, except volume (in mm<sup>3</sup>). Global P values from one-way ANOVA. Bonferroni correction for paired comparisons.

<sup>†</sup>Value significantly higher than all the other catheters.

\*,<sup>‡</sup>Symbols represent significant differences between the marked pair of catheters in the same category.



**Figure 2.** Average lesion created by the 4 catheters tested in both perpendicular and tangential orientations. Standard deviations and statistical significance are shown in Table 3.

Tangentially aligning the catheter tip with the tissue blunted most of the lesion differences. Of note, the Blazer™ -OI created narrower lesions, and with less volume, than the SF-8 and CoolFlex™ catheters.

#### Time-to-Pop Assessment (50 W/180 s)

Table 4 shows that among the electrical parameters monitored during the applications, no significant differences between catheters were found. However, despite a similar power delivery, the CoolFlex™ and the ThermoCool® catheters were associated with significantly higher mean and maximum tip temperatures than the other catheters tested.

A steam pop occurred during 108 of the 120 RF applications (90%) before 180 seconds. Limiting the evaluation of the applications to the first 60 seconds, steam pops occurred

in 66 out of 120 applications (55%) using 50 W. Table 4 and Figure 3A summarize the time-to-pop assessment with respect to the perpendicular applications. During the first 30 seconds, the Blazer™ -OI did not induce any steam pop (0/12 applications), performing safer than the CoolFlex™ (8/12;  $P = 0.001$ ), and showing a slight trend towards a safer profile compared with the SF-15 (3/12;  $P = 0.07$ ). After 60 seconds of RF, the CoolFlex™ performed significantly worse than the other catheters as it invariably induced a steam pop (12/12;  $P < 0.001$ , between CoolFlex™ and the other catheters), contrasting with ThermoCool® (3/12), Blazer™ -OI (4/12), SF-30 (2/12), and SF-15 (6/12). Of note, at 60 seconds the SF catheter irrigated at 30 mL/min trended toward a lower propensity to induce steam pops than at 15 mL/min ( $P = 0.11$ ). Tangentially, the differences were nonsignificant (Table 4 and Fig. 3B).

**TABLE 4**  
Time-To-Pop Assessment (50 W, up to 180 seconds)

	50W, 30 mL/min				50W, 15 mL/min	Global
	BW ThermoCool®	SJM CoolFlex™	BSc Blazer™ OI	BW SF-30	BW SF-15	P Value
<b>Perpendicular</b>						
# Lesions	12	12	12	12	12	
Voltage (V)	60.7 ± 1.8	60.6 ± 1.6	59.6 ± 1.8	59.8 ± 2.5	60.8 ± 1.6	n.s.
Current (mA)	805 ± 17	834 ± 12	845 ± 20	835 ± 22	826 ± 18	n.s.
Power (W)	49.8 ± 0.2	49.9 ± 0.1	49.8 ± 0.4	49.8 ± 0.2	49.9 ± 0.2	n.s.
Impedance (Ω)						
– Initial	121 ± 14	110 ± 16	115 ± 16	117 ± 15	123 ± 16	n.s.
– Final	93 ± 12	96 ± 18	92 ± 17	88 ± 15	92 ± 11	n.s.
– Minimum	85 ± 11	84 ± 14	82 ± 13	83 ± 15	87 ± 13	n.s.
Tip Temperature (°C)						
– Mean	38.4 ± 3.2* •	41.2 ± 6.5 <sup>‡</sup> ¶ ¶	34.8 ± 2.5 <sup>‡</sup>	33 ± 1.4* • <sup>‡</sup> ¶	33.4 ± 0.8* ¶	<0.001
– Maximum	43.9 ± 4.8	48.2 ± 14.6* •	42 ± 11.8	37.9 ± 1.8*	36.8 ± 1.2*	0.008
Pop before 30s	1 (8%)	8 (67%)	0 (0%)	2 (17%)	3 (25%)	
Pop before 60s	3 (25%)	12 (100%)	4 (33%)	2 (17%)	6 (50%)	
Pop before 90s	9 (75%)	12 (100%)	9 (75%)	8 (67%)	8 (67%)	
Pop before 180s	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	9 (75%)	11 (91%)	
<b>Tangential</b>						
# Lesions	12	12	12	12	12	
Voltage (V)	59.9 ± 1.4	59.7 ± 1.6	59.2 ± 1.7	59.6 ± 1.8	59.7 ± 1.6	n.s.
Current (mA)	831 ± 14	844 ± 16	852 ± 19	838 ± 19	838 ± 18	n.s.
Power (W)	49.8 ± 0.2	49.9 ± 0.1	49.9 ± 0.1	49.8 ± 0.2	49.9 ± 0.1	n.s.
Impedance (Ω)						
– Initial	109 ± 10	114 ± 13	112 ± 21	111 ± 18	113 ± 12	n.s.
– Final	86 ± 12	89 ± 16	88 ± 14	84 ± 14	87 ± 11	n.s.
– Minimum	82 ± 10	83 ± 13	82 ± 14	80 ± 14	83 ± 12	n.s.
Tip Temperature (°C)						
– Mean	43.2 ± 5.0* • <sup>‡</sup> ¶	41.5 ± 7.4 <sup>‡</sup> ¶ ¶ <sup>‡</sup> ¶	36.1 ± 2.0 <sup>‡</sup> ¶	33.5 ± 1.2* ¶	34.0 ± 0.7 <sup>‡</sup> ¶	<0.001
– Maximum	46.3 ± 4.3* • <sup>‡</sup> ¶	44.7 ± 9.1 <sup>‡</sup> ¶ ¶ <sup>‡</sup> ¶	39.0 ± 2.0 <sup>‡</sup> ¶	37.5 ± 1.4* ¶	36.8 ± 1.4* <sup>‡</sup> ¶	<0.001
Pop before 30s	2 (17%)	5 (42%)	3 (25%)	2 (17%)	2 (17%)	
Pop before 60s	7 (58%)	9 (75%)	9 (75%)	7 (58%)	7 (58%)	
Pop before 90s	9 (75%)	10 (83%)	10 (83%)	9 (75%)	9 (75%)	
Pop before 180s	11 (92%)	11 (92%)	11 (92%)	9 (75%)	10 (83%)	

Values: Mean ± SD. Electrical data compared using one-way ANOVA. Bonferroni correction for paired comparisons.

Impedance and tip temperature data are the values obtained until pop occurred or the end of the application (180 seconds).

\*, †, •, ‡, ¶, § Symbols represent significant differences (P < 0.05) between the marked pairs of catheters in the same category.

### IR Camera Thermal Evaluation (20 W, 17 mL/min, 60 seconds)

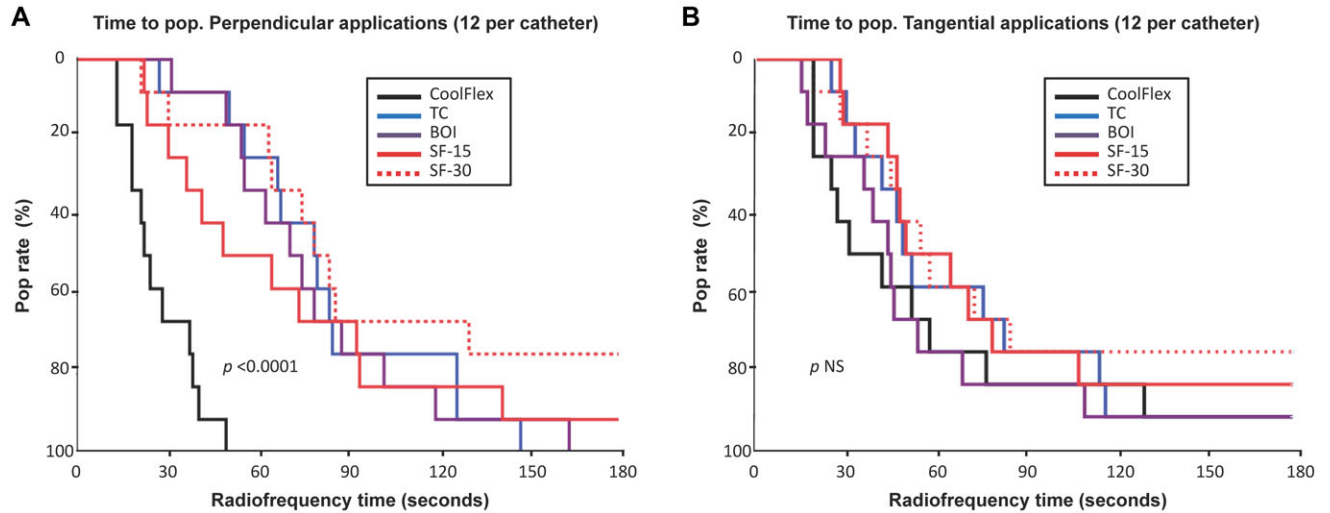
Figure 4 shows the heat transfer process of each catheter applying RF orthogonally to the tissue, plotted as temperature-distance graphs. No significant differences were observed between the thermal profiles of the ThermoCool®, Blazer™-OI, and CoolFlex™ catheters. However, at the same irrigation flow, the SF catheter focused its maximum calorific effect on deeper areas. The depth of the maximum temperature recorded with each catheter were as follows: ThermoCool®: 5.3 ± 3.2 mm; Blazer™-OI: 4.7 ± 1.7; CoolFlex™: 3.9 ± 1.9, and SF: 8.1 ± 1.6 mm (P = 0.004). A sub-group analysis of the differences between the SF and the others showed that it became overtly significant against both the CoolFlex™ (P = 0.003) and the Blazer™-OI catheters (P = 0.03), and showed a trend toward significance with the ThermoCool® catheter (P = 0.1). After 60 seconds of application, at 2 mm depth, the SF catheter was associated with the lowest internal temperatures (ThermoCool®: 59.2 ± 15.2 °C; Blazer™-OI: 54.6 ± 11.2; CoolFlex™: 51.8 ± 9.2 and SF: 40.5 ± 4.1 °C; P = 0.03). At 3 mm, the SF again showed a trend to induce lower temperatures (ThermoCool®: 61.8 ± 13.9 °C; Blazer™-OI: 57.5 ± 12.5;

CoolFlex™: 57.7 ± 2.7, and SF: 44.8 ± 7.3 °C; P = 0.067). Thereafter, no differences were found in local temperatures as tissue depth progressed.

By analyzing the heat transfer as the maximum temperature recorded at any part of the sample, as a function of time, we found that with all 4 catheters greater than 60% of the maximum tissue temperature was achieved in the first 20 seconds (TC: 66.5%, BOI: 63.3%, CF: 60.8%, SF: 61.4%).

### Discussion

The principal finding of this comparative study is that catheter design impacts on lesion creation and safety profile. These differences mainly appear at perpendicular applications. They can be summarized as: (1) the SF catheter at conventional irrigation parameters preserved the superficial layers to a greater degree, and focused its maximum thermal effect deeper than the other catheters tested. Moreover, it created the largest superficial footprint at the irrigation flow suggested by the manufacturer (8 mL/min), and the smallest one at 17 mL/min; (2) the CoolFlex™ catheter created significantly smaller lesions than the SF, which might suit thinner-layered substrates like atria. However, it should be used with caution at high power settings since it readily



**Figure 3.** A: Kaplan-Meier survival free of pop for constant 50 W perpendicular applications. B: Kaplan-Meier survival free of pop for constant 50 W tangential applications.

induced steam pops at 50 W when placed perpendicular to the tissue without temperature control; (3) no major differences were found between Blazer<sup>TM</sup>-OI and ThermoCool<sup>®</sup>.

#### Rationale for New RF Open-Irrigated Catheter Designs

Newer irrigated catheters aim to improve the irrigation efficacy. The SF and the CoolFlex<sup>TM</sup> catheters provide a theoretical better irrigation flow by providing more outflows around the whole tip (Table 1).<sup>14,18</sup> An optimized irrigation process might decrease the amount of necessary fluid and diminish the risk of acute heart failure in long procedures. Actually, the SF manufacturer recommends the use of one-half of the standard irrigation flows.<sup>14</sup> Irrigation flow recommended for the CoolFlex<sup>TM</sup> catheter is 10-17 mL/min. The Blazer<sup>TM</sup>-OI manufacturer claims an improved cooling capacity through an optimized external washing design and a better internal cooling, through dual chambers, reducing proximal heating of the tip to prevent thrombus.<sup>19</sup> These new generation catheters may add complexity to the ablation procedure as they may not behave similarly in terms of efficacy and safety, challenging the operator. Moreover, the differences in tip length and diameter of these catheters (Table 1) may translate into different lesion patterns even using the same RF parameters. At the present time, only one study has experimentally compared these new generation open-irrigated catheters, showing minor differences among them.<sup>13</sup> However, the lack of perfused tissue in their model and the use of low power settings might limit their conclusions.

#### Efficacy Analysis at 30 W

At 30 W, the highest tip temperatures were reached by the ThermoCool<sup>®</sup> catheter in both orientations (Table 2). This indicates that this previous-generation catheter cools the electrode-tissue interface less efficiently than the other catheters, reaching maximum temperatures clearly above 40 °C. In contrast, Blazer<sup>TM</sup>-OI and SF at 17 mL/min presented the lowest maximum temperatures (~36-37 °C), in agreement with a previous work.<sup>13</sup> These results confirm a better cooling as specified by manufacturers.<sup>14,18,20</sup> Of note, the SF catheter, using less than one-half of the standard ir-

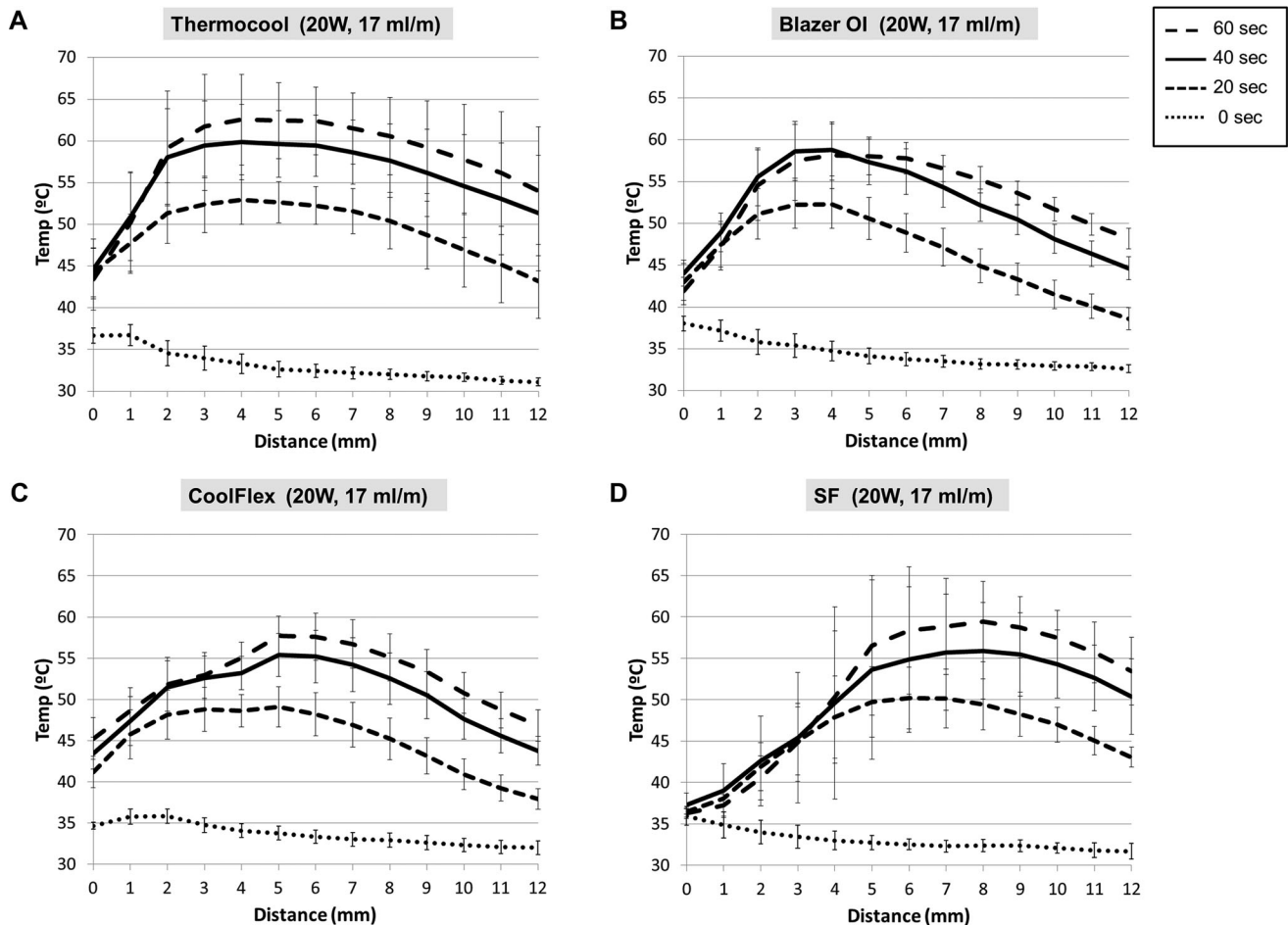
rigation flow, achieved tip temperatures considerably cooler than ThermoCool<sup>®</sup>. The CoolFlex<sup>TM</sup> catheter displayed an intermediate behavior. Thus, operators switching to newer catheters should be aware that virtually all the programmed power will be delivered, as opposed to less-efficient designs that may be more prone to deliver less power due to temperature cut-offs.

Regarding lesion morphology, our study showed differences among the catheters tested in the perpendicular orientation (Table 3), similar to previous *in vitro* work in non-perfused cardiac tissue.<sup>13</sup> These differences were blunted in the tangential orientation, where lesions were usually smaller and shallower.<sup>21,22</sup> This can be explained as the current density is lower at tangential as opposed to perpendicular orientations on account of a larger electrode-tissue interface.<sup>15,22</sup> Some potential reasons why the performance of catheters is not expected to be similar at tangential and perpendicular orientations are discussed elsewhere.<sup>22</sup> The SF catheter created the largest (volume) and widest (maximum diameter) perpendicular lesions (higher than CoolFlex<sup>TM</sup> at both 17 and 8 mL/min). The SF-17 and Blazer<sup>TM</sup>-OI concentrated their maximum effect (depth of maximum diameter) significantly deeper than the CoolFlex<sup>TM</sup>. In addition, the SF at 17 mL/min was the catheter that best preserved the interface tissue. This might be useful to treat specific substrates that require deeper lesions while preserving the surface. Unlike the SF, the CoolFlex<sup>TM</sup> created smaller, narrower and more superficial lesions. This may provide an added safety value that could be particularly useful when performing applications on thin atrial walls.

#### Safety at High Power Settings (50 W)

No distinct thrombi or charring were found after our 10 g applications. This is in agreement with previous studies showing no thrombus below 20 g of contact force using 30 and 50 W with an open irrigated catheter,<sup>10</sup> or even at 60 g using 20 and 30 W.<sup>16</sup> Steam pops did not occur at 30 W but they did at 50 W. Clinically, steam pops can be associated with endocardial rupture and pericardial tamponade.





**Figure 4.** Infrared camera thermal evaluation in bovine ventricular tissue (20 W, 17 mL/min). A: ThermoCool®. B: Blazer™ Open-Irrigated. C: CoolFlex™. D: ThermoCool® SF. Note the differential pattern in D as compared to A-C, showing that SF focuses its maximal thermal effect deeper and preserves the superficial layers better.

As inferred from Table 4 and Figure 3B, perpendicularly, at 50 W, the CoolFlex™ did not appear to cool the electrode-tissue interface and superficial layers sufficiently. Indeed, the CoolFlex™ showed the highest rate of steam pops among the catheters tested at 30 and 60 seconds, the regular time window for clinical applications. Although its manufacturer advises limiting the applications to no more than 60 seconds, this limit proved to be nonsafe in this set of experiments. This susceptibility to pops was not observed clearly in the tangential orientation. The peculiar irrigation bellow in the CoolFlex™ tip<sup>18</sup> may not effectively cool the superficial layers when positioned completely perpendicular at high powers. It could also be hypothesized that the 4 holes on the distal electrode surface might become partially blocked at this orientation.

### Lesion Thermodynamics

As shown in Figure 4D, the SF catheter (at 17 mL/min) performed best at refrigerating the electrode tissue-interface (0 mm in the tangential axis of the figure). This result was consistent with the electrical data obtained in the thigh muscle (Table 2), as the SF-17 catheter displayed the lowest tip temperatures. Moreover, it also explains why the lesions generated by SF-17 had the smallest superficial footprint (Table 3). Additionally, whereas the other catheters tested

showed a somewhat similar heat transfer pattern, the pattern generated by the SF-17 catheter was clearly different since it reached its maximal thermal effect on deeper layers compared with the others. Though consistent, this difference was not so striking analyzing the values of depth of the maximum diameter in the thigh model experiments (Table 3). The apparent maximum thermal effect on the 30 W SF-17 lesions was a significant 20% deeper than the CoolFlex™ and a nonsignificant 10% than the ThermoCool®. Differences may be partly explained by the lack of internal perfusion in the infrared model where we were unable to replicate these applications with the SF at 8 mL/min since steam pops consistently occurred.

Although no increased complications were reported during the isolation of pulmonary veins with the SF catheter in recent studies,<sup>2,3</sup> an oral communication at Heart Rhythm Congress 2013 reported major complications in 5 out of 20 patients during ablation of atrial fibrillation (3 tamponades and 2 fatal atrio-esophageal fistulas with no steam pops).<sup>1</sup> In this regard, the manufacturer has recently released a safety notice to warn about a 5- to 14-fold increased rate of adverse events with the SF catheter as compared with the standard ThermoCool®.<sup>5</sup> We believe that our data with slightly larger lesions, with a deeper maximum thermal effect, might shed some light on the underlying cause of these reported major complications.

### Study Limitations

This evaluation was performed in a swine thigh muscle setup. This well-established model<sup>10,11,14,15</sup> was chosen to carefully control most of the factors influencing lesion formation and typical complications arising from the procedure (charring, thrombus, and pops). However, the incidence of pop may not be extrapolated to clinical practice since it might be lower in beating hearts than in thigh muscle. However, since experiments were performed at 10 g of contact force, pop rates should increase if actual contact is higher.<sup>10</sup> The internal temperatures reached during the thermodynamic evaluation in ventricular tissue were different than clinically expected, especially at deep layers. This was due to non-perfused heart sections and the application of only 20 W due to steam pops at higher output. Finally, to standardize energy delivery, no temperature cut-off was applied, but unfortunately, relying on tip temperature does not effectively prevent steam pops.<sup>10</sup>

### References

1. Santucci P, Thomas K, Vasaiwala S, Cytron J, Green A, Winterfield J, Wilber D: Initial experience of major complications with a 56 hole irrigated ablation catheter. *Heart Rhythm* 2013;10:S1-S554.
2. Bertaglia E, Fassini G, Anselmino M, Stabile G, Grandinetti G, De SA, Calo L, Pandozi C, Pratola C, Zoppo F, Tondo C, Iuliano A, Gaita F: Comparison of ThermoCool(R) Surround Flow catheter versus ThermoCool(R) catheter in achieving persistent electrical isolation of pulmonary veins: A pilot study. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2013;24:269-273.
3. Park CI, Lehrmann H, Keyl C, Weber R, Schurr P, Schiebeling-Romer J, Allgeier J, Herrera CS, Kienzle RP, Shah D, Neumann FJ, Arentz T, Jadidi AS: Enhanced efficiency of a novel porous tip irrigated RF ablation catheter for pulmonary vein isolation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2013;24:1328-1335.
4. Wright GA, Skanes AC: A new catheter for pulmonary vein isolation: The whole story? *J Cardiovasc Electrophysiol* 2013;24:1336-1337.
5. Urgent Field Safety Notice: ThermoCool® SF NAV Catheter Family. Biosense Webster 2014.
6. ThermoCool® SF Diagnostic/Ablation Deflectable Tip Catheter Instructions for Use. Biosense Webster 2012.
7. Instructions for Use (IFU) Therapy™ Cool Flex™ Ablation Catheter USA. Irvine Biomedical Inc., a St. Jude Medical Company 2013.
8. NaviStar® ThermoCool® Diagnostic/Ablation Catheter. Instructions for use. Biosense Webster 2013.
9. Blazer Open-Irrigated Ablation Catheter. Directions for Use. Boston Scientific 2014.
10. Yokoyama K, Nakagawa H, Shah DC, Lambert H, Leo G, Aebly N, Ikeda A, Pitha JV, Sharma T, Lazzara R, Jackman WM: Novel contact force sensor incorporated in irrigated radiofrequency ablation catheter predicts lesion size and incidence of steam pop and thrombus. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1:354-362.
11. Yokoyama K, Nakagawa H, Wittkampf FH, Pitha JV, Lazzara R, Jackman WM: Comparison of electrode cooling between internal and open irrigation in radiofrequency ablation lesion depth and incidence of thrombus and steam pop. *Circulation* 2006;113:11-19.
12. Everett TH, Lee KW, Wilson EE, Guerra JM, Varosy PD, Olgin JE: Safety profiles and lesion size of different radiofrequency ablation technologies: A comparison of large tip, open and closed irrigation catheters. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009;20:325-335.
13. Guerra JM, Jorge E, Raga S, Galvez-Monton C, Alonso-Martin C, Rodriguez-Font E, Cinca J, Vinolas X: Effects of open-irrigated radiofrequency ablation catheter design on lesion formation and complications: In vitro comparison of 6 different devices. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2013;24:1157-1162.
14. Nakagawa H: Comparison of 12 and 56 Hole Electrodes for Open Irrigated Radiofrequency Ablation in a Canine Thigh Muscle Preparation: Improvement in Thrombus Reduction with 56 Small Irrigation Holes. Biosense Webster website 2010.
15. Nakagawa H, Wittkampf FH, Yamanashi WS, Pitha JV, Imai S, Campbell B, Arruda M, Lazzara R, Jackman WM: Inverse relationship between electrode size and lesion size during radiofrequency ablation with active electrode cooling. *Circulation* 1998;98:458-465.
16. Thiagalingam A, D'Avila A, Foley L, Guerrero JL, Lambert H, Leo G, Ruskin JN, Reddy VY: Importance of catheter contact force during irrigated radiofrequency ablation: Evaluation in a porcine ex vivo model using a force-sensing catheter. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010;21:806-811.
17. Cao H, Tungjitkusolmun S, Choy YB, Tsai JZ, Vorperian VR, Webster JG: Using electrical impedance to predict catheter-endocardial contact during RF cardiac ablation. *IEEE Trans Biomed Eng* 2002;49:247-253.
18. St. Jude Medical. Therapy™ Cool Flex™ RF ablation catheter pre-clinical results. St. Jude Medical website 2013.
19. Oley L, Koblish J, Mirigan M, Tee S, Harvey G, Subramaniam R: Use of high-resolution infrared thermography to analyze thermal profiles of a novel cooled RF ablation catheter. *Heart Rhythm* 2009;6 (Suppl 1):S217.
20. Blazer™ Open-Irrigated Ablation Catheter. Total Tip Cooling™ Design on the Blazer Catheter Platform. Boston Scientific 2012.
21. Petersen HH, Chen X, Pietersen A, Svendsen JH, Haunso S: Temperature-controlled radiofrequency ablation of cardiac tissue: An in vitro study of the impact of electrode orientation, electrode tissue contact pressure and external convective cooling. *J Interv Card Electrophysiol* 1999;3:257-262.
22. Wood MA, Goldberg SM, Parvez B, Pathak V, Holland K, Ellenbogen AL, Han FT, Alexander D, Lau M, Reshko L, Goel A: Effect of electrode orientation on lesion sizes produced by irrigated radiofrequency ablation catheters. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009;20:1262-1268.

## LETTER TO THE EDITOR

To the Editor

I read with great interest the experimental study by Moreno *et al.*<sup>1</sup> involving a morphological and thermodynamic comparison of the thermal lesions created by different open-irrigated catheters, and would like to comment on the results obtained by thermography.

Although the colored images from an infrared camera are interesting, previous experimental studies on radiofrequency (RF) ablation have rarely used this technique as it provides only surface thermal images.<sup>2</sup> Unfortunately, in RF ablation research we are essentially interested in the cross-section of the heated tissue, i.e., where heat plays an important role in creating deep lesions. When thermal images have previously been used to explore the cross-section,<sup>3</sup> the heated material was previously divided into 2 parts, which could be rapidly separated to allow exposure of a cross-section of the heated zone, the separation plane being accurately centered under the ablating electrode. Thin films of polyethylene were also laid on the surfaces between the 2 blocks of material to facilitate their separation. However, in the experimental setup conducted by Moreno *et al.*,<sup>1</sup> only *half of the tissue* was employed in order to have the tissue surface permanently exposed to the thermographic camera. This arrangement may not necessarily be an incorrect choice, although the fact of having used open-irrigated electrodes in the context of an endocardial ablation raises certain doubts. My concern is basically about whether this setup really reproduced the actual performance of the saline and its interaction with the tissue. I assume that when an open-irrigated electrode is used for RF ablation, infused saline does not infiltrate far into the endocardium, i.e., it does not correspond with the case of an interstitial infusion, such as that observed in needle-like RF electrodes used in tumor ablation,<sup>4</sup> in which the saline itself is infused into the target tissue to improve the electrical and thermal performance. I highlight this distinction since the temperature profiles shown in Moreno *et al.*<sup>1</sup> in Figure 4 peaked at several millimeters from the electrode surface (even 7 mm in some cases). These thermal profiles bring me back to those obtained during RF tumor ablations with externally irrigated RF electrodes (also known as perfused or open-irrigation electrodes), in which the injected saline flow involves a thermal convection phenomenon, which in turn significantly improves the heat transfer capacity of the tissue and considerably alters the amount of tissue heated. I suspect that during the experiments conducted by Moreno *et al.*<sup>1</sup> infused saline was able to somehow travel through the

tissue and hence heat deeper zones, which does not seem to be the case in a real scenario.

The doubtfulness of the thermographic results is apparent when one compares the lesion depths estimated from histology (Fig. 2) and thermography (Fig. 4), both after a 60-second RF ablation. The lesion depth values showed in particular in Figure 2 are at a power of 30 W and are surprisingly smaller than those shown in Figure 4 at a power of 20 W (values estimated by observing where the 50 °C isotherm line crosses the temperature profile). By assuming the histology as a reference method, thermography in this particular case seems to overestimate the lesion depth due to a badly chosen experimental setup.

In addition, a previous experimental study compared closed- and open-irrigated electrodes and found that the temperature peak was never located beyond 3 mm from the electrode surface.<sup>6</sup> On the same line of reasoning, this study also found that lesion depth was similar with closed- and open-irrigated electrodes,<sup>6</sup> which suggests that saline possibly does not infiltrate into the cardiac tissue.

To sum up, I think that the temperature distributions obtained with the thermographic camera in the study by Moreno *et al.*<sup>1</sup> are questionable, since they were obtained with an experimental method which could be based on a different performance to the real one. More information on the interaction between saline and tissue surface during the experiments with the thermographic camera would certainly be required.

ENRIQUE BERJANO, PH.D.

From the Biomedical Synergy, Electronic Engineering Department, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain

### References

1. Moreno J, Quintanilla JG, Molina-Morúa R, García-Torrent MJ, Angulo-Hernández MJ, Curiel-Llamazares C, Ramiro-Bargueño J, González P, Caamaño AJ, Pérez-Castellano N, Rojo-Álvarez JL, Macaya C, Pérez-Villacastín J: Morphological and thermodynamic comparison of the lesions created by 4 open-irrigated catheters in 2 experimental models. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014;25:1391-1399.
2. Wood MA, Goldberg SM, Parvez B, Pathak V, Holland K, Ellenbogen AL, Han FT, Alexander D, Lau M, Reshko L, Goel A: Effect of electrode orientation on lesion sizes produced by irrigated radiofrequency ablation catheters. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009;20:1262-1268.
3. Labonté S: Numerical model for radio-frequency ablation of the endocardium and its experimental validation. *IEEE Trans Biomed Eng* 1994;41:108-115.
4. Kim JH, Kim PN, Won HJ, Shin YM: Percutaneous radiofrequency ablation with internally cooled versus internally cooled wet electrodes for small subphrenic hepatocellular carcinomas. *J Vasc Interv Radiol* 2013;24:351-356.
5. Curley MG, Hamilton PS: Creation of large thermal lesions in liver using saline-enhanced RF ablation. *Proceedings of the 19th International Conference—IEEE/EMBS Oct. 30 – Nov. 2, 1997, Chicago, IL, USA*, pp. 2516-2519.
6. Yokoyama K, Nakagawa H, Wittkamp FH, Pitha JV, Lazzara R, Jackman WM: Comparison of electrode cooling between internal and open irrigation in radiofrequency ablation lesion depth and incidence of thrombus and steam pop. *Circulation* 2006;113:11-19.

*J Cardiovasc Electrophysiol*, Vol. 26, p. E6, July 2015.

Address for correspondence: Enrique Berjano, Ph.D., Universitat Politècnica de València - I Biomedical Synergy, Electronic Engineering Department 7F, Camino de Vera, Valencia 46022, Spain. Fax: 34-96-387-7609; E-mail: eberjano@eln.upv.es

doi: 10.1111/jce.12647

## Towards the Dynamic Assessment of the Lesion Generation Process in an Experimental Model of Cardiac Ablation

To the Editor

We thank Dr. Berjano for the opportunity to discuss the clinical relevance of our recent findings in 2 experimental models of radiofrequency (RF) catheter ablation.<sup>1,2</sup> First of all, it is important to recall that no model is without limitations. For example, the use of an *in vivo* model of cardiac lesions would have been desirable for our purposes, but the application of RF energy to *in vivo* porcine hearts usually produces ventricular fibrillation after ~30 seconds, even during amiodarone infusion.<sup>3</sup> After that, the internal cooling provided by the tissue perfusion is lost, which clearly limits this seemingly sound model. In our study, we initially used a well-established *in vivo* thigh model,<sup>4</sup> where we could control most of the factors involved in RF lesions in an internally perfused and blood-superfused tissue. As additional data, we reported thermal imaging experiments on nonperfused bovine tissue so as to evaluate the internal thermodynamics that we were missing on the first model.

We agree, and acknowledged in the paper, that the thermal imaging approach has important limitations: (1) the internal temperatures reached during the thermodynamic evaluation in ventricular tissue are different than clinically expected. This is mostly because of the use of nonperfused heart sections and the application of only 20 W because of steam pops at higher power outputs; (2) the filmed cross-section had to be completely uncovered due to the poor penetration depth of infrared radiation, thus allowing room air to cool the filmed area. Therefore, we agree with Dr. Berjano that the clinical correlation that can be made with this data might be unclear. Nonetheless, this approach allowed us to objectively determine a differential heating pattern of one of the tested catheters as compared to the others under identical experimental conditions.

Dr. Berjano believes that a different thermal imaging model in which the tissue slabs are previously divided into 2 parts separated by a film of polyethylene to rapidly expose the cross-section of the heated zone at a certain time during ablation<sup>5</sup> may be more “physiologic” and so less prone to

error. However, unlike our model that provides a dynamic monitoring of the whole process of lesion generation, the setup described by Dr. Berjano would have only enabled us to obtain a static picture of the internal tissue temperatures at a specific time point when the upper half of the slab and the polyethylene film were removed. Furthermore, such approach is not without additional limitations since the sharp disruption of the fibers and the polyethylene film in the middle of the ablated tissue produce a change of the boundary conditions in the process of lesion generation, as air does in our model.

We also believe that Dr. Berjano states a few misconceptions in his letter. Dr. Berjano comments the following: “I suspect that during the experiments conducted by Moreno *et al.*<sup>2</sup> infused saline was able to somehow travel through the tissue and hence heat deeper zones, which does not seem to be the case in a real scenario.” We understand that Dr. Berjano’s concern is that a small fraction of the irrigation provided by the catheter might have interacted superficially with the exposed cross section of the tissue and heated it despite a careful catheter positioning. Well, in open-irrigated cardiac ablation, saline (which is at room temperature) is not meant to heat the tissue, but quite the contrary: saline cools the electrode–tissue interface allowing for longer and deeper RF applications preventing thrombus or charring formation. This is consistent with our reported lower temperatures at the electrode–tissue interface (0 mm) and the first millimeters of the lesion, and with the smaller superficial diameters and deeper maximum diameters of the lesions created with these open-irrigated catheters, as described elsewhere.<sup>4</sup>

Dr. Berjano questions our findings as he remarks that our reported lesions were smaller using 30 W *in vivo* than 20 W *ex vivo*. It is important to note that, even though the external cooling produced by blood and saline irrigation is present in both *in vivo* thigh tissue and *ex vivo* cardiac tissue models, the latter model (used for thermal imaging) lacks internal perfusion. Internal perfusion cools down the tissue and decreases overheating, being crucial in the process of lesion generation which in the end is just a heat source/sink balance. Indeed, internal perfusion is the main contributor to the internal cooling of the tissue, especially at deep layers. Thus, the reported results are absolutely expected, as the *ex vivo* model lacks internal perfusion. This extremely important fact appears to have been overlooked by Dr. Berjano in his interpretation of our data. If the internal perfusion were not so important, there would not be a point at all in testing new catheters using the thigh model, which is the FDA’s favorite.

Another misconception from Dr. Berjano comes when he states that a finding from another previously published paper “... suggests that saline possibly does not infiltrate into the cardiac tissue” as a way of saying that the latter fact in real

J Cardiovasc Electrophysiol, Vol. 26, pp. E7-E8, July 2015.

J. Moreno and J. G. Quintanilla contributed equally to this paper.

Supported by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), European Union, and Instituto de Salud Carlos III, Spain (RD12/0042/0036 [RIC], RD06/0003/0009 [REDINSCOR]).

Address for correspondence: Javier Moreno, M.D., Ph.D. and Jorge G. Quintanilla, M.S.Eng., Hospital Clínico San Carlos. C\ Profesor Martín Lagos S/N, CP 28040, Madrid, Spain. Fax: +34913303527; E-mail: jmoreno@secardiologia.es / jgarciaqui.hcsc@salud.madrid.org

doi: 10.1111/jce.12646



cardiac ablation goes against our reported data. We cannot see how that statement can criticize our findings, because in our models, as well as in real cardiac ablation, saline does not infiltrate into the tissue because it is immediately washed away by the surrounding circulating blood.

Finally, Dr. Berjano states that “a previous experimental study compared closed- and open-irrigated electrodes and found that the temperature peak was never located beyond 3 mm from the electrode surface.”<sup>3</sup> We could have used the approach by Yokoyama *et al.*<sup>3</sup> of inserting fluoroptic temperature probes at 3 and 7 mm depth to monitor the internal temperature of the tissue at only 2 different depths. Undoubtedly, those scarce temperature readings would have been closer to the clinical reality than our thermal imaging measurements as their boundary conditions would have been more realistic, but they would not have enabled a global assessment of the process of lesion generation as our model does from 0 to 12 mm depth. Finally, the fact that their temperature peaks were “never located beyond 3 mm from the electrode surface” is only speculation as the referred paper only worked with probes at 0, 3, and 7 mm, so internal temperature measurements from 3 to 7 mm were lacking.

Thus, although any experimental model that provides thermal imaging has significant limitations, we believe that these complementary data provided important information that deserved to be reported additionally to the data obtained with the thigh model. It clearly determined a differential behavior of one catheter as compared with the others under exactly the same experimental conditions. Unfortunately, we still do not have a methodology to dynamically monitor the global process of tissue heating with realistic boundary

conditions, but thermal imaging is a promising first step in this direction.

JAVIER MORENO, M.D., Ph.D.<sup>\*,†</sup>

JORGE G. QUINTANILLA, M.S.ENG.<sup>\*,‡</sup> and

JULIÁN PÉREZ-VILLACASTÍN, M.D., Ph.D.<sup>\*</sup>

From the <sup>\*</sup>Optical and Thermal Mapping Laboratory, Arrhythmia Unit, Cardiovascular Institute, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC); <sup>†</sup>Arrhythmia Unit, Cardiology Department, Hospital Ramón y Cajal; and <sup>‡</sup>Advanced Development in Arrhythmia Mechanisms and Therapy Laboratory, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, Spain

## References

1. Berjano E: Letter to the Editor. J Cardiovasc Electrophysiol 2015;26:E7–E8.
2. Moreno J, Quintanilla JG, Molina-Morua R, Garcia-Torrent MJ, Angulo-Hernandez MJ, Curiel-Llamazares C, Ramiro-Bargueno J, Gonzalez P, Caamano AJ, Perez-Castellano N, Rojo-Alvarez JL, Macaya C, Perez-Villacastin J: Morphological and thermodynamic comparison of the lesions created by 4 open-irrigated catheters in 2 experimental models. J Cardiovasc Electrophysiol 2014;25:1391-1399.
3. Petersen HH, Chen X, Pietersen A, Svendsen JH, Haunso S: Lesion dimensions during temperature-controlled radiofrequency catheter ablation of left ventricular porcine myocardium: Impact of ablation site, electrode size, and convective cooling. Circulation 1999;99:319-325.
4. Yokoyama K, Nakagawa H, Wittkampf FH, Pitha JV, Lazzara R, Jackman WM: Comparison of electrode cooling between internal and open irrigation in radiofrequency ablation lesion depth and incidence of thrombus and steam pop. Circulation 2006;113:11-19.
5. Labonte S: Numerical model for radio-frequency ablation of the endocardium and its experimental validation. IEEE Trans Biomed Eng 1994;41:108-115.





# Skeletal myoblast implants induce minor propagation delays, but do not promote arrhythmias in the normal swine heart

Javier Moreno<sup>1\*†</sup>, Jorge G. Quintanilla<sup>1†</sup>, Antonio López-Farré<sup>1</sup>, Tamara Archondo<sup>1</sup>, Raquel Cervigón<sup>2</sup>, Paloma Aragoncillo<sup>1</sup>, Elena Usandizaga<sup>1</sup>, Jacobo Silva<sup>1</sup>, Cruz Rodríguez-Bobada<sup>1</sup>, José Luis Rojo<sup>3</sup>, Nicasio Pérez-Castellano<sup>1</sup>, Sergey Mironov<sup>4</sup>, Lluís Mont<sup>5</sup>, Teresa Pérez de Prada<sup>1</sup>, Carlos Macaya<sup>1</sup> and Julián Pérez-Villacastín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Optical Mapping Laboratory, Arrhythmia Unit and Cardiovascular Institute, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Group of Bioengineering Innovation, University of Castilla-La Mancha, Cuenca, Spain; <sup>3</sup>Signal Theory Department, Rey Juan Carlos University, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Center for Arrhythmia Research, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA; and <sup>5</sup>Arrhythmia Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Received 20 April 2010; accepted after revision 1 July 2010; online publish-ahead-of-print 30 July 2010

## Aims

Whether skeletal myoblast (SM) implants are proarrhythmic is still controversial due to conflicting pre-clinical and clinical data. We hypothesized that if SM implants are arrhythmogenic, they will facilitate the induction of ventricular tachyarrhythmias by promoting heterogeneous propagation of activation wavefronts.

## Methods

Skeletal myoblast cells were harvested from 10 pigs. A month later,  $125 \pm 37 \times 10^6$  cells were subepicardially injected in an area of  $\sim 2 \text{ cm}^2$  at the anterolateral aspect of the left ventricle. Four weeks later, a ventricular stimulation protocol was conducted. Once explanted, epicardial wavefronts over SM and adjacent control areas were optically mapped. Eight saline-injected animals were used as controls. To compare with clear arrhythmogenic substrates, propagation patterns were also evaluated in infarcted hearts and on a SM-implanted heart following amiodarone infusion.

## Results

In SM hearts, fibrosis and differentiated SM cells were consistently found and no tachyarrhythmias were induced. Wavefronts propagated homogeneously over SM and adjacent areas, with no late activation zones, as opposed to the infarcted hearts. The time required for the wavefronts to depolarize both areas were similar, becoming only slightly longer at SM areas after an extra-stimulus ( $P = 0.025$ ). Conduction velocities and APD<sub>90</sub> were also similar. Saline hearts showed similar results. The extent of the conduction delay was not related to the number of injected SM cells.

## Conclusion

In normal swine hearts, myoblast implants promote localized fibrosis and slightly retard epicardial wavefront propagation only after extra-stimuli. However, SM implants are not associated with local re-entry and do not facilitate ventricular tachyarrhythmias in the whole normal heart.

## Keywords

Optical mapping • Skeletal myoblasts • Arrhythmias

## Introduction

Pilot clinical studies on the transplantation of skeletal muscle precursor cells (skeletal myoblasts; SM) into infarcted areas seemed promising.<sup>1–3</sup> However, sustained ventricular arrhythmias were initially reported,<sup>1–3</sup> challenging initial high expectations.<sup>4,5</sup>

However, the suggested proarrhythmia has not been confirmed by recent major clinical trials that have shown that ventricular arrhythmia rates are as to be expected for such a selected sick population<sup>4–7</sup> so controversy remains.<sup>8–11</sup>

Animal studies have produced inconclusive data.<sup>12–16</sup> Thus, to further evaluate the safety of SM implants, we tested in a large

\* Corresponding author. Tel/fax: +34 913303527, Email: jmoreno@secardiologia.es

† These authors contributed equally.

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2010. For permissions please email: journals.permissions@oxfordjournals.org.



whole mammal heart (swine) if implants *per se* facilitate the induction of ventricular arrhythmias in the normal *in situ* heart and if they can promote theoretically proarrhythmic propagation patterns.

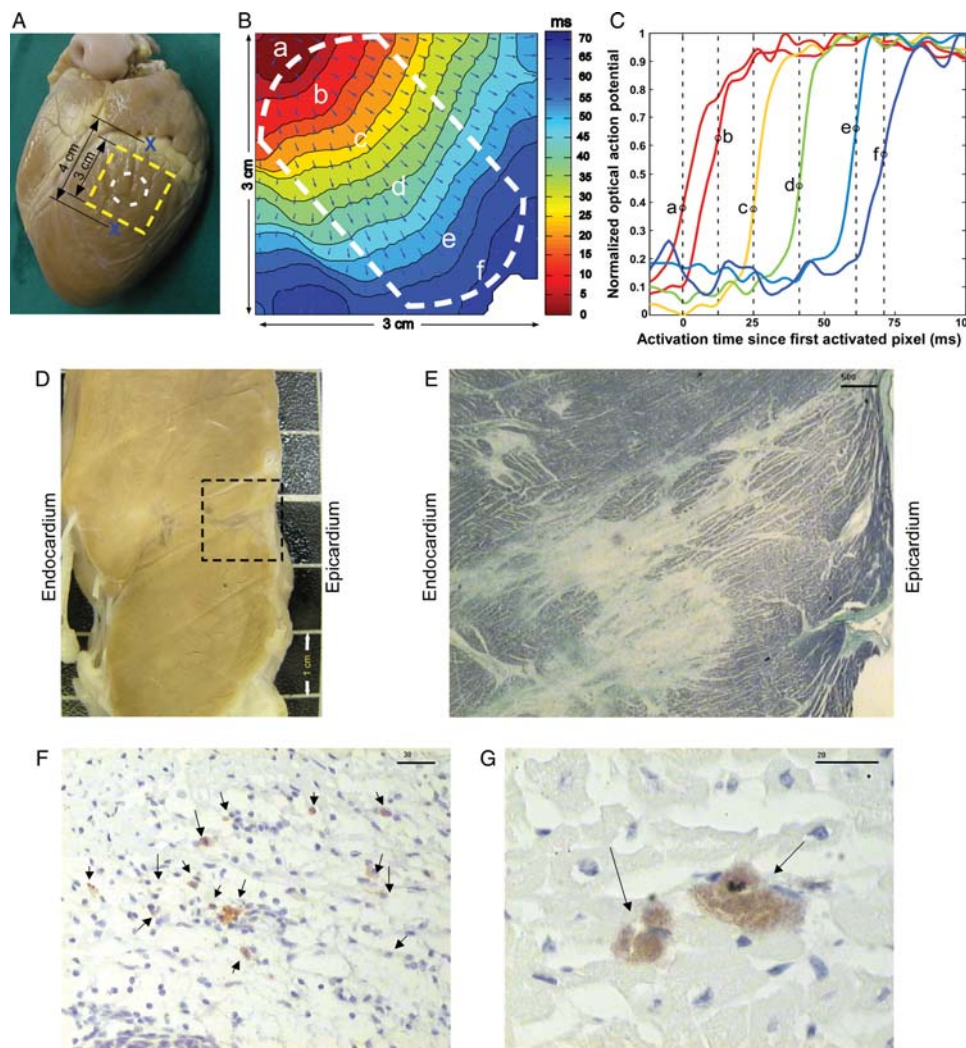
## Methods

### Experimental model and surgical protocol

This study complied with national guidelines (RD 1201/2005). Female adult Pietrain pigs (30–40 kg) were selected. Ten animals

underwent SM implants. All surgeries were performed under general anaesthesia (propofol, fentanyl, and isoflurane) by a cardiac surgeon involved in clinical trials with SM implants.

A 5–7 gr biopsy of the sternohyoid muscle was retrieved for myoblast isolation. A month later, a left thoracotomy was performed to expose the anterolateral aspect of the left ventricle. Two non-absorbable suture stitches (4–0 polypropylene) were placed as markers (Figure 1A). The SM suspension (1.5–2 mL) was injected tangentially by 3–5 subepicardial injections over a  $\sim 2 \text{ cm}^2$  area around a midpoint between the two sutures using a prebent 25 gauge needle. Four weeks later, hearts were



**Figure 1** (A) The location of the implant zone and sutured ties (X) used as references. The white circle shows the injection site and the yellow square represents the filmed area. (B) An example of velocity vectors over an isochrone map. The white dashed line marks the area selected to calculate the mean CV. (C) Phase 0 of local action potentials taken at different pixels from the adjacent isochrone map, as used to depict the activation wavefront. The local activation time corresponds to the timing of the maximum positive slope as marked by a small circle. (D) Macroscopic view of an implanted zone showing a whitish triangular wedge embedded in normal myocardium. Linear lesions represent the injection trajectories. The affected zone is limited to  $\sim 1 \text{ cm}$  depth. (E) Masson's stain of an implant zone. White areas representing fibrosis can be observed surrounded by normal myocardium. Scale bar =  $500 \mu\text{m}$ . (F) Microscopic detection of implanted cells. Arrows point at differentiated myotubes stained with BMDV1025 antibodies dispersed within the fibrous tissue in an implant zone. Scale bar =  $30 \mu\text{m}$ . (G) At injury boundaries, away from connective tissue, groups of 3–4 cells stained with BMDV1025 (arrows) are shown among normal cardiomyocytes. Scale bar =  $20 \mu\text{m}$ .

exposed and programmed electrical stimulation (PES) was performed. In one animal, this procedure was undertaken 5 months after SM implant to evaluate a long-term proarrhythmia.

## Isolation and preparation of myoblasts

Biopsies were digested with trypsin (0.5 mg/mL) and collagenase (0.5 mg/mL). After filtering through a nylon net (80  $\mu$ m), cells were grown in the Ham-F12 medium (GIBCO-BRL) supplemented with 20% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin (GIBCO-BRL). Cultures were incubated and passages were performed (every  $\sim$ 10 days) at subconfluence (80%) to prevent myotube formation. Skeletal myoblast were harvested after 2–4 passages for a total of  $\sim$ 100–200  $\times$  10<sup>6</sup> cells. Before implant, cells were washed to eliminate any fetal calf serum and re-suspended in the autologous serum (50–80  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL). Assessment of myoblasts was performed by flow cytometry using antibodies against CD45 and desmin.

## In situ data: programmed electrical stimulation

Any spontaneous arrhythmia, including ventricular ectopies (VE), was monitored (Prucka CardioLab, GE) during a 30 min interval, under anaesthesia, before manipulation of the heart, at the second (pre-SM implant) and the third surgical procedures. At the latter procedure, PES was conducted pacing close to the implant zone. Pacing was performed at 500, 400, and 300 ms basic drive cycle length (BDCL) adding up to two extra-stimuli. We also paced at the most rapid cycle length ensuring 1:1 capture and then suddenly stopped to record any triggered activity. No atrial stimulation was performed as no major atrial proarrhythmia would be expected.

## Isolated heart preparation and optical recordings

Hearts were then explanted and taken to a Langendorff's apparatus to be perfused and superfused with 37°C oxygenated Tyrode's solution. Pacing was performed at the left upper corner of the field of view (3  $\times$  3 cm<sup>2</sup>) over an SM zone or an adjacent (more septal or lateral) control area. Pacing included 500, 400, and 300 ms (S1) adding one extra-stimulus (S2) to 500 and 400 ms. Optical mapping (OM) movies (2") were recorded by a CCD camera (Dalsa Inc., Ontario, Canada) at 800 frames/s, using Di4ANEPPS.<sup>17</sup> Recordings included S1 and S2 beats 10 ms longer than the effective ventricular refractory period (EVRP). Movies were recorded with a spatial resolution of 64  $\times$  64 pixels: 0.47 mm/pixel.

To stabilize, the heart was gently compressed against the surface of the superfusion chamber. Recordings of the initial propagation of depolarization wavefronts are usually free from motion artefacts, so electromechanical uncouplers (Cyto-D) were only used in a single experiment as control.

## Control hearts and additional experiments

Eight animals underwent the whole protocol but were injected 2 mL of saline instead. Additional experiments were performed

to register overt epicardial slow conduction. Three animals underwent transmural ischaemic infarctions by percutaneous balloon occlusion during 90 min of the mid anterior descending artery in one case and proximal circumflex artery in two. Four weeks later, OM and PES were performed over the borders of the infarcted epicardium on the isolated hearts. Another animal underwent the regular protocol but 1.5 mL of sterile 98% ethanol was injected instead to induce a localized chemical infarction. On one of the SM-injected isolated hearts, after completion of the protocol, stimulation was repeated 5 min after adding 300 mg amiodarone to the 5 L of perfusion.

## Data processing and analysis

The propagation dynamics of S1 and S2 depolarization wavefronts were analysed and isochrone maps were computed (Figure 1B and C). We defined total activation time (TAT) as the time required for a wavefront to depolarize the whole field of view. Local velocity vectors were computed.<sup>18</sup> When homogeneous propagation was found, we defined mean conduction velocity (CV) as the average of the values of all vectors in a selected wide area parallel to the direction of the fastest propagation (Figure 1B). APD<sub>90</sub> duration was defined as optical action potential duration at 90% re-polarization, averaging values from 10 non-adjacent pixels.

S2 beats propagate slower than S1 beats, so TAT after S2 (TAT-S2) should be longer than after S1 beats. We wanted to quantify whether TAT-S2 were longer at SM zones, compared with adjacent ones, and if the potential delay in TAT-S2 over SM zones was related to the number of injected cells. Thus, we calculated for each SM-implanted heart (at 500 and 400 ms) the per cent variation in TAT-S2 over the SM zone referred to the adjacent one, as follows:

$$\Delta\text{TAT-S2}_{\text{SM-control}}(\%) = \left( \frac{\text{TAT-S2}_{\text{SM}} - \text{TAT-S2}_{\text{Control}}}{\text{TAT-S2}_{\text{Control}}} \right) \times 100$$

Positive values of  $\Delta\text{TAT-S2}_{\text{SM-control}}$  mean that the time required for the S2 wavefront to depolarize the whole field of view is greater in the SM area than in the adjacent zone.

## Histological analysis

Samples were fixed in 10% formaldehyde and paraffin-embedded. Pieces were cut into 4  $\mu$ m thick sections to be stained with haematoxylin–eosin and Masson's trichrome. A monoclonal antibody marker (BMDV1025, clone MY-32, IgG1-k; Accuratechemical) was used to detect skeletal fast myosin, representing mature skeletal myocytes.

## Statistical analysis

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD. The paired t-test was used to compare the incidence of VE and repeated-measures ANOVA to compare TAT, CV, and APD<sub>90</sub> in the SM and the saline groups. Pearson's correlation coefficient was used to evaluate  $\Delta\text{TAT-S2}$  values and the number of injected cells. To compare the propagation patterns between SM and infarction groups, we used Fisher's exact test. A two-tailed *P*-value of  $<0.05$  was considered significant.

## Results

### Histology analysis

SM-implanted samples showed whitish triangular-shape wedges embedded among the normal-coloured myocardium. The base of the wedges corresponded to the epicardium and the apex was limited to the upper mid-myocardium (Figure 1D). Lesion sizes were relatively similar. The mean epicardial area affected measured  $2.4 \pm 0.4 \text{ cm}^2$ , with lesions reaching a depth of  $0.9 \pm 0.2 \text{ cm}$ . Lesions showed the areas of vascularized fibrosis embedded within normal myocardium (Figure 1E). Connective tissue was more prominent around injection sites and included granulomas and inflammatory cells. We consistently found skeletal myocytes marked with antibodies, dispersed within preserved myocardium, and in the connective tissue (Figure 1F). Immunohistochemical staining confirmed the survival of the cells, as it marks differentiated myotubes from the original myoblasts. Skeletal myocytes were found both dispersed and arranged in small groups, adopting rounded or fusiform morphologies. The density of skeletal cells clearly declined from the areas close to the injection trajectories to the boundaries of the wedge, but differentiated skeletal cells were found slightly farther, among normal myocardium, and away from injection trajectories (Figure 1G). Saline hearts showed similar macroscopic findings with an extent and distribution of connective tissue around injection sites indistinguishable from SM hearts.

### In-situ programmed electrical stimulation

No animal died spontaneously between the implant and the sacrifice surgery. No differences were found in the incidence of spontaneous VE comparing the second ( $1.4 \pm 1.5 \text{ VE}$ ) and the third surgical procedure ( $1.3 \pm 1.9 \text{ VE}$ ;  $P = \text{NS}$ ) in the SM experiments. Saline experiments showed similar results ( $1.2 \pm 1.6$  vs.  $1.4 \pm 1.6$ ;  $P = \text{NS}$ ). Effective ventricular refractory period at 500, 400, and 300 ms were  $283 \pm 24$ ,  $248 \pm 18$ , and  $238 \pm 29 \text{ ms}$  in the SM group and  $278 \pm 25$ ,  $251 \pm 15$ , and  $234 \pm 23 \text{ ms}$  in the saline one ( $P = \text{NS}$ ). No ventricular arrhythmia lasting more than one VE was elicited in any *in situ* heart, whether SM or saline injected. No ventricular-triggered activity, AF, or any other arrhythmias were induced in any of both groups.

### Optical recordings in skeletal myoblast hearts

Isochrone maps showed homogeneous propagation patterns in both SM and adjacent zones (Figure 2A). No late depolarization zones, lines of block, or tortuous propagation patterns were found. No ventricular arrhythmia (beyond 1 VE) was induced in the isolated hearts.

Total activation time values increased after S2 beats as compared with S1 ( $P = 0.001$ ) and as the cycle length decreased ( $P = 0.0001$ ; Figure 3A). Although globally we did not find significant differences comparing TAT at SM versus adjacent zones ( $P = 0.6$ ), a significant interaction was found regarding SM zone and the addition of an S2 ( $P = 0.025$ ) indicating a slight but significantly prolonged TAT in SM zones only after an extra-stimulus. No

positive correlation was found between the extent of S2-induced propagation delay over SM zones ( $\Delta\text{TAT-S2}_{\text{SM-control}}$ ) and the number of injected cells:  $r = -0.49$  at 500 ms ( $P = 0.15$ ) and  $r = -0.61$  at 400 ms ( $P = 0.06$ ; Figure 3D).

As the propagation patterns were homogeneous, a mean epicardial CV per isochrone map was determined. Epicardial CV was slower after S2 beats ( $P = 0.012$ ) and decreased with the shortening of the BDCL ( $P = 0.001$ ; Figure 3B). Although no significant differences were found between CV at SM vs. control zones ( $P = 0.8$ ), a trend ( $P = 0.2$ ) towards slower CV in SM zones after S2 was observed.

APD<sub>90</sub> decreased following S2 ( $P = 0.002$ ) and with the decrease in cycle length ( $P < 0.0001$ ; Figure 3C). However, we found no significant differences in APD<sub>90</sub> comparing SM with adjacent zones.

The experiment performed 5 months after the SM implant and the one with Cyto-D showed similar results. Propagation patterns were homogeneous and TAT, CV, and APD<sub>90</sub> determinations fell in the mean  $\pm$  SD of the remaining values.

### Optical recordings in control hearts

Relatively similar results were found in the saline-injected hearts (Figure 3E–G). Total activation time analysis showed a significant interaction regarding injection zones and S2 ( $P = 0.04$ ), suggesting a slightly prolonged TAT in the saline-injected zones only after an extra-stimulus. No significant differences were found comparing mean CV and APD<sub>90</sub>. No ventricular arrhythmias were induced.

### Additional experiments

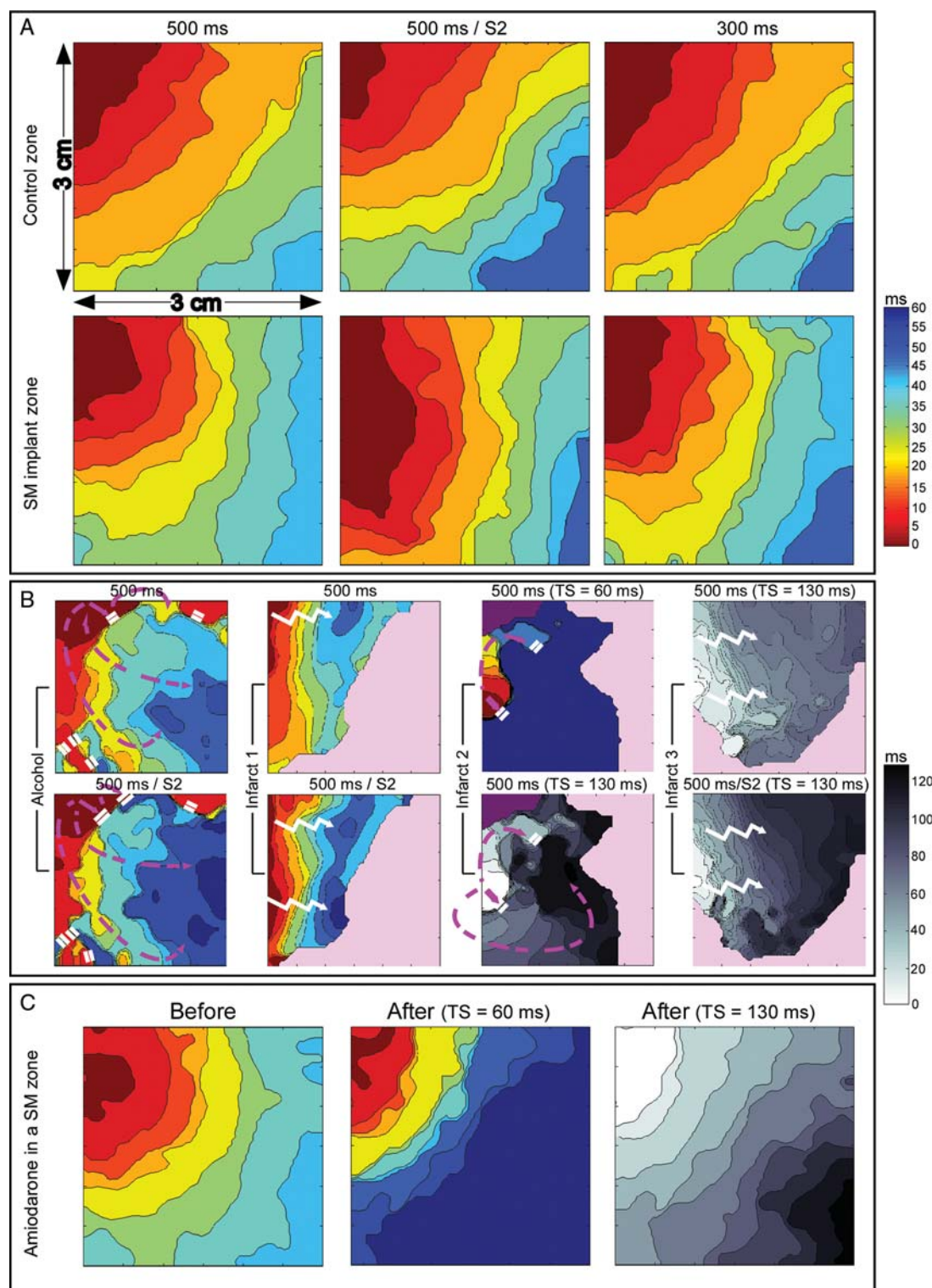
The chemical infarction (Figure 2B, leftmost panels) showed late depolarization zones and lines of conduction block within a heterogeneous propagation pattern. Figure 2B also illustrates the propagation over the transition zones between normal and ischaemic-infarcted tissue (pink masks) showing overt slow conduction in infarct 1 (mean CV: 35 cm/s at S1 and 24 cm/s at S2) and 3 (36 cm/s at S1 and 28 cm/s at S2) and a heterogeneous pattern in infarct 2. Pacing with a single extra-stimulus or at 300 ms (as in SM hearts) eventually induced sustained ventricular tachycardia or ventricular fibrillation (VF) in the four isolated infarcted hearts. We classified as pathological propagation those isochrones maps showing local re-entry or overt slow conduction (CV values at 500/S2 two SD lower than the mean CV from the adjacent zones of the control hearts). All these four hearts showed pathological propagation as opposed to SM zones ( $P = 0.002$ ).

Figure 2C shows isochrone maps of a propagated beat over the SM zone of an SM-injected heart at baseline and after adding amiodarone. Amiodarone increased TAT from 46.8 to 126 ms due to a decrease in CV from 79.3 to 25.7 cm/s. However, the homogeneous pattern of activation was preserved. Pacing at 300 ms eventually induced VF.

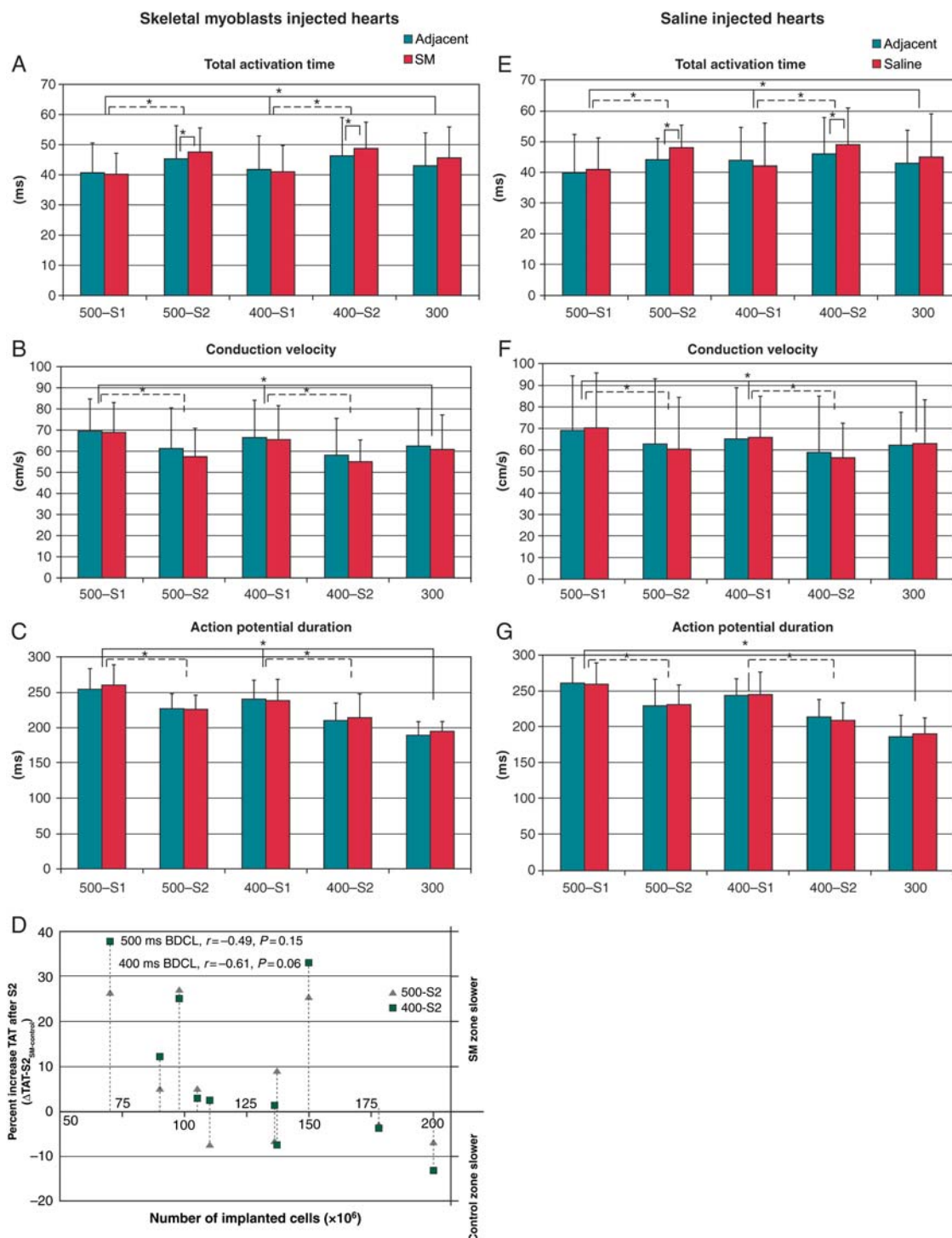
## Discussion

This study found that SM implants induce local fibrosis but do not significantly alter epicardial wavefront propagation in the normal pig heart. The minor propagation delay found after extra-stimuli





**Figure 2** (A) Isochrone maps illustrating the relatively homogeneous patterns of activation of paced wavefronts in a representative heart at a control (upper row) and an adjacent SM zone (lower row). (B) Epicardial wavefront propagation over a chemically infarcted area (alcohol) and three ischaemic infarctions (1, anterior; 2 and 3, lateral). Maps reflect slow conduction, with the alcohol and infarct 2 showing significant heterogeneous propagation and conduction blocks (white parallel lines) forcing wavefronts to curve (dashed magenta arrows), paving the way for re-entry. Pink masked areas represent scar. In infarct 2, both maps show the same beat at different time scales to allow comparison with remaining maps. Purple area was excluded due to poor signal-to-noise ratio. (C) Isochrone maps of an SM-implanted area before (left) and after amiodarone (central and right maps). The rightmost panel is the same propagation map than the central one, at a time scale of 0–130 ms. Velocities significantly not slower but the propagation pattern remained homogeneous. TS, time scale.



**Figure 3** (A) TAT at 500, 400, and 300 ms (S1) and after adding an S2, comparing SM and adjacent control zones. TAT increased after S2 ( $P = 0.001$ ) and as the BDCL shortened ( $P = 0.0001$ ). Only after S2, a slight but a significant ( $P = 0.025$ ) prolonged TAT was found in the SM zones. (B) Mean CV were slower after S2 beats ( $P = 0.012$ ) and decreased with the BDCL shortening ( $P = 0.001$ ). We found a minor trend ( $P = 0.2$ ) towards slower mean CV in the SM zones after S2. (C) Repolarization times shortened following extra-stimuli ( $P = 0.002$ ) and as the BDCL decreased ( $P = 0.0001$ ), but there were no differences between both the zones. (D) The number of injected cells and extent of S2-induced delay over the SM zones when compared with the adjacent control areas ( $\Delta TAT-S2_{SM-control}$ ). Values on the upper portion mean cases where the delay was higher in the SM than in the control zone. No positive correlation was found. (E–G) Similar findings in the saline group. TAT increased after S2 ( $P = 0.002$ ), as the BDCL shortened ( $P = 0.001$ ), and over injected zones after S2 ( $P = 0.04$ ). CV decreased after S2 ( $P = 0.01$ ), as the BDCL shortened ( $P = 0.001$ ) but not significantly over injected zones. Repolarization times shortened after S2 ( $P = 0.001$ ) and with the BDCL shortening ( $P = 0.001$ ). \* $P < 0.05$ .

was not sufficient to promote proarrhythmia. Saline induced similar results, suggesting that injection-induced fibrosis and not SM cells caused this minor propagation delay.

## Electrophysiological findings

Because SM do not electrically couple with surrounding myocardium, speculation has arisen suggesting that SM may act as arrhythmogenic substrates.<sup>19</sup> We found that SM do not seem to provoke spontaneous ventricular arrhythmias, as an equivalent low rate of VE was observed before and after implantation. As the animal was under anaesthesia, we cannot rule out that catecholamines might facilitate ectopies. However, in an SM rat model, close monitoring during regular activities did not show any increase in spontaneous arrhythmias.<sup>20</sup>

Pacing the whole heart *in situ* did not induce ventricular arrhythmias, suggesting that implants do not generate a clear re-entry substrate. On a more regional basis, we focused on wavefront propagation over SM and adjacent zones and found similar homogeneous patterns. No heterogeneous or slow propagation was elicited as opposed to the infarcted hearts. Even after slowing CV in an SM heart with amiodarone, no heterogeneous propagation or re-entry focus was unmasked.

We found only a slightly higher TAT over implanted areas after pacing with extra-stimuli close to refractoriness. This minor delay did not seem to be large enough to promote re-entry. This finding was found in saline-injected hearts as well, suggesting that it is probably due to induced fibrosis, more than due to dispersed non-coupled skeletal myocytes within the myocardium. The fact that increasing the number of injected cells did not increase the delay supports this hypothesis, as recently suggested by the MAGIC investigators.<sup>4</sup>

## Arrhythmogenesis in clinical studies

Skeletal myoblast implants were associated with variable rates of ventricular arrhythmias.<sup>1–3,6</sup> Reported arrhythmic events range from 0% to 20% of all implanted patients.<sup>2,3,6,21,22</sup> The arrhythmic rates reported in such studies might be attributed to the patients' myocardial scars. The MAGIC trial showed that the proportion of patients who experienced ventricular arrhythmias was not significantly different between the myoblast-treated groups (which differed by the number of injected cells) and the placebo-injected group.<sup>4</sup> Similar results have recently been reported in a 4-year follow-up study.<sup>5</sup>

## Arrhythmogenesis in previous experimental models

A non-infarction model concluded that re-entrant arrhythmias can be induced in a monolayer coculture of human SM and neonatal rat ventricular myocytes.<sup>15</sup> However, their density of SM was clearly much higher than reported engraftment rates in humans.<sup>19</sup> In our study, SM were injected at a conventional clinical dosage. Our findings might be explained by the low density of SM achieved using the standard implantation techniques.

An infarction model in rats found that the arrhythmia inducibility was significantly higher in SM-implanted hearts.<sup>20</sup> However, these findings were not confirmed in a larger heart model (canine) in wedges of either normal or infarcted hearts.<sup>16</sup> Probably, this may

be explained by the higher thickness of larger hearts (100 times bigger) where the trauma of injections and the whole volume of engrafted SM are proportionally smaller. In that canine model, similar transmural propagation was found in wedges with and without SM pacing from the endocardium and a slightly slower transmural propagation in SM regions pacing epicardially, with no induced transmural re-entry.

## Limitations

Optical mapping was limited to the epicardium as transmural propagation has already been evaluated previously and no re-entry was elicited.<sup>16</sup> This study was limited to normal hearts. The subtle conduction disturbances found may have a more pronounced proarrhythmic effect in a diseased environment, so we cannot speculate on any possible proarrhythmic interaction between SM implants and infarcted tissue. We believe that due to the irregular borders of ischaemic infarctions, with scars and transition zones interspersed heterogeneously, it would be extremely difficult to assess and properly quantify whether the SM implant-induced local fibrosis and the surviving cells actually modify the proarrhythmia of the ischaemic substrate. This has already been attempted<sup>16</sup> concluding that SM implants do not modify the arrhythmic ischaemic milieu. We believe that if SM implants are clearly proarrhythmic, they should promote re-entry in the normal heart and that was not the case in our study. We mainly focused on re-entry, expanding our model to conditions known to provoke triggered activity may allow to further study such arrhythmia mechanisms.

Our stimulation protocol did not include a third extra-stimulus in order to decrease the chances of inducing probably unspecific VF episodes, being VF in the pig sometimes very difficult to defibrillate. However, two extra-stimuli protocols have previously been used with induction rates over 90% of the ones achieved using three extra-stimuli.<sup>23,24</sup>

## Conclusions

In the normal swine heart, myoblast implants mainly promote patches of fibrosis especially around injection trajectories, but preserving a homogeneous global conduction. Compared with adjacent zones, SM and saline implants induce a marginal prolongation of epicardial wavefront propagation times only evident after extra-stimuli. In this large mammal model, SM implants did not seem to intrinsically create significant local re-entry substrates and did not facilitate ventricular tachyarrhythmias.

**Conflict of interest:** none declared.

## Funding

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI 04/0747 and FIS RD06/0003/0009 Redinscor) and the Spanish Society of Cardiology (Beca Investigación Básica).

## References

1. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**:1078–83.
2. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of

- postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004;**148**:531–7.
3. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountiokos M, Onderwater EE, Lee CH et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2003;**42**:2063–9.
  4. Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008;**117**:1189–200.
  5. Veltman CE, Soliman OI, Geleijnse ML, Vletter WB, Smits PC, ten Cate FJ et al. Four-year follow-up of treatment with intramyocardial skeletal myoblasts injection in patients with ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2008;**29**:1386–96.
  6. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation* 2005;**112**:1748–55.
  7. Ben-Dor I, Fuchs S, Kornowski R. Potential hazards and technical considerations associated with myocardial cell transplantation protocols for ischemic myocardial syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2006;**48**:1519–26.
  8. Ly HQ, Nattel S. Stem cells are not proarrhythmic: letting the genie out of the bottle. *Circulation* 2009;**119**:1824–31.
  9. Macia E, Boyden PA. Stem cell therapy is proarrhythmic. *Circulation* 2009;**119**:1814–23.
  10. Menasche P. Stem cell therapy for heart failure: are arrhythmias a real safety concern? *Circulation* 2009;**119**:2735–40.
  11. Smith RR, Barile L, Messina E, Marban E. Stem cells in the heart: what's the buzz all about? Part 2: arrhythmic risks and clinical studies. *Heart Rhythm* 2008;**5**:880–7.
  12. Al AN, Carrion C, Ghostine S, Garcin I, Vilquin JT, Hagege AA et al. Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovasc Res* 2003;**58**:142–8.
  13. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;**4**:929–33.
  14. Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:7808–11.
  15. Abraham MR, Henrikson CA, Tung L, Chang MG, Aon M, Xue T et al. Anti-arrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res* 2005;**97**:159–67.
  16. Fouts K, Fernandes B, Mal N, Liu J, Laurita KR. Electrophysiological consequence of skeletal myoblast transplantation in normal and infarcted canine myocardium. *Heart Rhythm* 2006;**3**:452–61.
  17. Moreno J, Zaitsev AV, Warren M, Berenfeld O, Kalifa J, Lucca E et al. Effect of remodelling, stretch and ischaemia on ventricular fibrillation frequency and dynamics in a heart failure model. *Cardiovasc Res* 2005;**65**:158–66.
  18. Bayly PV, KenKnight BH, Rogers JM, Hillsley RE, Ideker RE, Smith WM. Estimation of conduction velocity vector fields from epicardial mapping data. *IEEE Trans Biomed Eng* 1998;**45**:563–71.
  19. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**:879–88.
  20. Fernandes S, Amirault JC, Lande G, Nguyen JM, Forest V, Bignolais O et al. Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res* 2006;**69**:348–58.
  21. Gavira JJ, Herreros J, Perez A, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Martin-Herrero F et al. Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction: 1-year follow-up. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;**131**:799–804.
  22. Siminiak T, Fiszer D, Jerzykowska O, Grygielska B, Rozwadowska N, Kalmucki P et al. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J* 2005;**26**:1188–95.
  23. Groban L, Deal DD, Vernon JC, James RL, Butterworth J. Ventricular arrhythmias with or without programmed electrical stimulation after incremental overdosage with lidocaine, bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine. *Anesth Analg* 2000;**91**:1103–11.
  24. Simonson JS, Gang ES, Mandel W, Peter T. Increasing the yield of ventricular tachycardia induction: a prospective, randomized comparative study of the standard ventricular stimulation protocol to a short-to-long protocol and a new two-site protocol. *Am Heart J* 1991;**121**:68–76.



# Cell-based therapy of the failing heart: a need to connect for proper electrical and contractile function

Larissa Fabritz<sup>1</sup>, Bernd K. Fleischmann<sup>2</sup>, Boris Greber<sup>3</sup>, and Paulus Kirchhof<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiology and Angiology, University Hospital Münster, Albert-Schweitzer-Straße 33, D-48149 Münster, Germany; <sup>2</sup>Institute of Physiology I, Life and Brain Center, University of Bonn, Bonn, Germany; and <sup>3</sup>Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Human Stem Cell Pluripotency Group, Münster, Germany

Received 8 September 2010; accepted after revision 19 September 2010

**This editorial refers to ‘Skeletal myoblast implants induce minor propagation delays, but do not promote arrhythmias in the normal swine heart’ by J. Moreno *et al.*, on page 1637**

Despite clear improvements in acute therapy and chronic management, myocardial infarction remains a severe threat to cardiac function.<sup>1,2</sup> In contrast to other organs, the heart has only limited regeneration capacity. Therefore, most of the cardiomyocytes that die in the process of acute myocardial ischaemia are replaced by dysfunctional scar tissue. In this context, regeneration of infarcted areas of the heart via application of progenitors/stem cells is a fascinating prospect. Clinical observations suggested a beneficial effect of injecting bone marrow-derived cells into coronary arteries<sup>3–5</sup> or skeletal myoblasts into hearts during open heart surgery<sup>6,7</sup> in survivors of myocardial infarction with heart failure, resulting in a high expectation that regeneration of the left ventricle could be instigated by such ‘regenerative therapy’. Subsequent larger trials found modest or no effects after intracoronary injection of bone marrow-derived cells.<sup>8–10</sup> Furthermore, careful clinical follow-up of patients who received myocardial injection of skeletal myoblasts identified the proarrhythmic side effects of such therapy.<sup>11,12</sup> It is difficult to align these findings which have been disputed widely. Most likely, different properties of the injected material, including different techniques of preparing and administering cells, as well as different patient characteristics contributed to the heterogeneity of the clinical findings. Given the potential for benefit and harm of treatment of failing hearts with precursor cells, we clearly need a better understanding of the physiological effects of precursor cells that interact with healthy and diseased myocardium, and of their potential side effects in the heart.

Moreno *et al.*<sup>13</sup> report on the electrical effects of injecting skeletal myoblasts in healthy pig hearts. They identified marginal

slowing of conduction distant to the implantation site *ex vivo* and did not identify any difference in arrhythmia induction between treated and SHAM-treated swine hearts, despite evidence of fibrous tissue close to the injection site. The authors are to be applauded for their systematic approach to the electrophysiological effects of implanting skeletal myoblasts in the beating large animal heart. This study provides important safety information by showing that the proarrhythmic effect that has been suggested by cell co-culture studies of healthy cardiomyocytes and mesenchymal precursor cells<sup>14</sup> does not translate into inducible arrhythmias in healthy large animal hearts.

Clearly, there is more to do, especially when considering potential differences in the degree of engraftment and that diseased myocardium such as the infarct zone is likely to be more vulnerable to slight conduction changes than healthy myocardium.<sup>15</sup> Furthermore, the molecular characterization of engrafted cells and potentially their genetic modification may help to improve the efficacy and safety of cell-based therapy of the heart in the future. In fact, genetically engineered enhanced electrical coupling between engrafted cells and the native myocardium via connexin expression may improve electrical stability and left ventricular function.<sup>15–17</sup> Furthermore, mobilization of bone marrow-derived cells by application of growth factors can improve cardiac contractile and electrical function in mice, especially in the infarct border zone, without affecting histological infarct size,<sup>18</sup> suggesting functional effects on the surviving ‘normal’ myocardium rather than true regeneration within the infarct.

Given that functional improvement after engraftment of adult progenitors and/or stem cells does not appear to be based on their transdifferentiation into cardiomyocytes<sup>19,20</sup> and that the overall effect is relatively modest, pluripotent stem cells appear to be an interesting alternative cell source.<sup>17</sup> However, their differentiation capacity into cardiomyocytes, their purification to avoid teratomas, and their long-term engraftment in the infarct to



provide sustained functional improvement still require lots of effort from basic scientists.<sup>21,22</sup> A very attractive autologous approach is the recently reported direct transprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using a set of only three well-defined cardiac transcription factors.<sup>23</sup> This could either allow to re-inject or transplant *in vitro* generated cardiomyocytes or tissue patches or to directly re-convert the fibrotic scar into the cardiac muscle using gene therapy.

Understanding the beneficial effects and the potential harm of cell-based therapy of the failing heart will require an interdisciplinary, 'translational' research approach. This requires close interactions between clinical investigators, translational cardiologists, basic scientists with a broad cardiac physiological expertise, and cell biologists. Such an interdisciplinary understanding of the effects of cell-based therapy should probably guide therapy selection and hence precede further evaluation of cell-based therapy in controlled clinical trials. The study by Moreno *et al.* is a valuable addition to our knowledge as it confers relevant safety information on the interaction of skeletal myoblasts with healthy myocardium. It is most likely that effective cell-based therapy of the failing heart needs to use different cells than those implanted by Moreno *et al.* At present, we can only speculate which cell-based therapy will be most helpful, whom it will help, and how the effects of these cells are mediated in the failing heart. We hope that well-coordinated interdisciplinary and 'translational' research will characterize the right cell-based therapy and the most suitable patients.

**Conflict of interest:** A full list of financial disclosures for PK is available on the home page of the ESC. LF has received funding from DFG and IZKF Münster.

## References

- Wijns W, Kolh P, Danchin N, Di Mario C, Falk V, Folliguet T *et al.* Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J* 2010;**31**:2501–55.
- Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* 2008;**29**:2388–442.
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N *et al.* Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;**106**:3009–17.
- Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J *et al.* Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;**108**:2212–8.
- Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H *et al.* Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;**361**:45–6.
- Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**:1078–83.
- Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D *et al.* Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;**357**:279–80.
- Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C *et al.* Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;**364**:141–8.
- Zohnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T *et al.* Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006;**295**:1003–10.
- Strauer BE, Yousef M, Schannwell CM. The acute and long-term effects of intracoronary stem cell transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *Eur J Heart Fail* 2010;**12**:721–9.
- Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L *et al.* The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008;**117**:1189–200.
- Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D *et al.* Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation* 2006;**114**(Suppl. 1):108–13.
- Moreno J, Quintanilla JG, López-Farré A, Archondo T, Cervigón R, Aragoncillo P *et al.* Skeletal myoblast implants induce minor propagation delays, but do not promote arrhythmias in the normal swine heart. *Europace* 2010;**12**:1637–44.
- Chang MG, Tung L, Sekar RB, Chang CY, Cysyk J, Dong P *et al.* Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an *in vitro* coculture model. *Circulation* 2006;**113**:1832–41.
- Roell W, Lewalter T, Sasse P, Tallini YN, Choi BR, Breitbach M *et al.* Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature* 2007;**450**:819–24.
- Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia Y *et al.* Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury. *Circulation* 2002;**105**:2435–41.
- Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM *et al.* Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 2006;**203**:2315–27.
- Kuhlmann MT, Kirchhof P, Klocke R, Hasib L, Stypmann J, Fabritz L *et al.* G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. *J Exp Med* 2006;**203**:87–97.
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M *et al.* Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;**428**:664–8.
- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J *et al.* Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004;**10**:494–501.
- Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;**91**:501–8.
- Passier R, Oostwaard DW, Snapper J, Kloots J, Hassink RJ, Kuijk E *et al.* Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* 2005;**23**:772–80.
- Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedanthan V, Hayashi Y, Bruneau BG *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010;**142**:375–86.





Original article

# Predictors of Luminal Loss in Pulmonary Veins After Radiofrequency Ablation

Susana Martín-Garre,<sup>a,\*</sup> Nicasio Pérez-Castellano,<sup>b</sup> Jorge G. Quintanilla,<sup>b</sup> Joaquín Ferreiros,<sup>a</sup> and Julián Pérez-Villacastín<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Radiología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Unidad de Arritmias, Instituto Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

Article history:

Received 12 July 2014

Accepted 11 December 2014

Keywords:

Atrial fibrillation  
Pulmonary veins  
Catheter ablation  
Stenosis  
Remodeling  
Magnetic resonance imaging

ABSTRACT

**Introduction and objectives:** The reported incidences of stenosis after radiofrequency ablation of pulmonary veins are highly variable. Moreover, most studies have focused on severe stenosis and have overlooked mild stenosis. Our aims were to study postablation morphological changes in the pulmonary veins and to evaluate preablation magnetic resonance imaging predictors for stenosis.

**Methods:** Eighty consecutive patients with atrial fibrillation underwent cardiac magnetic resonance imaging before undergoing radiofrequency ablation. Magnetic resonance imaging was repeated a median of 95 days after ablation. Ostium area/ellipticity and atrial volume were blindly assessed. We evaluated the presence of stenosis and classified it as mild (< 50% area reduction), moderate (50%-70%), and severe (> 70%).

**Results:** Postablation stenosis was identified in 78 of 322 veins (24.2%). The stenosis was mild in 66 (84.6%), moderate in 11 (14.1%), and severe in 1 (1.3%). All of them were asymptomatic. The left inferior pulmonary vein showed the highest frequency of stenosis, which was detected in 26% of them ( $P < .001$ ). A multiple regression analysis revealed that left inferior pulmonary vein (odds ratio = 3.089;  $P = .02$ ) and a greater preablation ostium area (odds ratio = 1.009;  $P < .001$ ) were independent predictors for postablation stenosis. Age (odds ratio = 1.033) showed a strong trend to statistical significance ( $P = .06$ ).

**Conclusions:** After ablation, vein ostia size is reduced and stenosis is detected in less than one third of patients. Most cases are mild, and severe stenosis is rare. Postablation stenosis is more likely to develop in older patients, those with larger vein ostia, and in the left inferior pulmonary veins.

© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Predictores de pérdida luminal de venas pulmonares tras ablación por radiofrecuencia

RESUMEN

**Introducción y objetivos:** La incidencia descrita de estenosis de venas pulmonares tras la ablación por radiofrecuencia es muy variable. Además, la mayoría de los estudios se han centrado en las estenosis graves y han prestado poca atención a las de carácter leve. El objetivo de este trabajo es estudiar los cambios morfológicos de las venas pulmonares después de la ablación y los posibles factores predictivos de estenosis en la resonancia magnética previa a la ablación.

**Métodos:** Se examinó mediante resonancia magnética cardíaca a un total de 80 pacientes consecutivos con fibrilación auricular antes de practicarles una ablación por radiofrecuencia. Se repitió la resonancia magnética una mediana de 95 días después de la ablación. Entre las variables estudiadas, se midió, utilizando un diseño ciego, el área/elipticidad del ostium, así como el volumen auricular. Se evaluó la presencia de estenosis y se clasificó como leve (< 50% de reducción del área), moderada (50-70%) o grave (> 70%).

**Resultados:** Se identificó estenosis tras la ablación en 78 de 322 venas analizadas (24,2%). La estenosis fue leve en 66 (84,6%) venas, moderada en 11 (14,1%) y grave en 1 (1,3%). Todas estaban asintomáticas. La vena pulmonar inferior izquierda es la que presentó la mayor frecuencia de estenosis: se detectó en un 26% de ellas ( $p < 0,001$ ). Un análisis de regresión múltiple reveló que el tipo de vena (vena pulmonar inferior izquierda, *odds ratio* = 3,089;  $p = 0,02$ ) y una mayor área del ostium antes de la ablación (*odds ratio* = 1,009;  $p < 0,001$ ) eran factores independientes predictivos de estenosis tras la ablación. La edad (*odds ratio* = 1,033) mostró una tendencia fuerte hacia la significación estadística ( $p = 0,06$ ).

Palabras clave:

Fibrilación auricular  
Venas pulmonares  
Ablación percutánea  
Estenosis  
Remodelado  
Resonancia magnética

\* Corresponding author: Servicio de Radiología, Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain.  
E-mail address: smgarre@gmail.com (S. Martín-Garre).



**Conclusiones:** Después de la ablación se produce una disminución del tamaño del ostium de las venas pulmonares y se detecta algún grado de estenosis en menos de una tercera parte de los pacientes. La mayoría son leves y las estenosis graves son excepcionales. Los pacientes de más edad, aquellos con venas de mayor tamaño y las venas inferiores izquierdas tienen mayor probabilidad de presentar estenosis.

© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Abbreviations

AF: atrial fibrillation  
MRI: magnetic resonance imaging  
PV: pulmonary vein

## INTRODUCTION

Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia. The incidence of AF is likely to rise because of the increasing age of the population.<sup>1</sup> The left atrium and proximal pulmonary veins (PVs) play key roles in the initiation and maintenance of AF.<sup>2</sup> This disorder can be initiated by rapid ectopic beats originating in sleeves of left atrium myocardium extending into the PVs.<sup>3</sup> Over the past decade, PV isolation by means of multiple consecutive radiofrequency energy applications around PV ostia has emerged as an effective and increasingly important therapeutic option for the treatment of AF.<sup>3-6</sup>

Stenosis of the PV has been identified as a complication of this procedure.<sup>7-9</sup> Its risk may be minimized by reducing the radiofrequency energy delivered and by avoiding applications inside the PVs.<sup>6,10,11</sup> Consequently, detailed knowledge of the PV anatomy in each patient may be essential to optimize PV isolation.<sup>12</sup>

Several studies have evaluated the incidence of severe PV stenosis after ablation, reporting percentages ranging widely from 0.0% to 42.4%.<sup>9,13-16</sup> However, little is known about minor degrees of luminal loss after ablation.

The aims of this study were: *a*) to accurately assess PV anatomical remodelling after ablation, and *b*) to look for potential predictors of risk of PV stenosis based on analysis of magnetic resonance imaging (MRI) studies performed before and after radiofrequency ablation of AF.

## METHODS

### Patients and Ablation Procedure

We studied 80 consecutive patients with symptomatic recurrent AF (either paroxysmal or persistent) refractory to antiarrhythmic drugs who were referred for AF radiofrequency ablation, in whom contrast-enhanced MRI was obtained before and approximately 3 months after the procedure (median of 95 days [interquartile range, 90-104 days]).

The ablation approach was ostial PV isolation using irrigated tip catheters (Navistar and Navistar Thermo-cool; Biosense Webster) and circular decapolar catheters (Lasso; Biosense Webster) with simultaneous use of an electro-anatomical mapping system (CARTO; Biosense-Webster) integrated with 3-dimensional MRI. The end point of ablation was to achieve bidirectional PV conduction block in all PVs.

The study protocol was approved by the local ethics committee and study patients gave written informed consent for the MRI and the ablation procedure.

## Image Acquisition

The cardiac MRI was performed with a 1-T (Signa LX; GE Medical Systems) or a 1.5-T system (Sigma Excite; GE Medical Systems). Gadolinium contrast injection timing for the angiographic sequence was performed either with a bolus tracking technique or a previous bolus timing acquisition (2 mL gadolinium contrast at a rate of 2 mL/s followed by a bolus of 20-30 mL of physiological solution at 2 mL/s), followed by a gadolinium-enhanced, breath-hold, 3-dimensional angiography in the coronal plane covering the left atrium and PVs (20 mL of gadopentetate dimeglumine at a rate of 2 mL/s followed by a bolus of 20 mL to 30 mL of physiological solution at 2 mL/s).

Electrocardiography-gated cine imaging was done to measure left atrium volumes using spoiled gradient echo sequences (1-T system) or steady-state free precession sequences (1.5-T system) acquired in adjacent axial planes covering the left atrium and proximal PVs during breath holding.

### Pulmonary Vein and Left Atrium Morphometry Measurements

Images from all studies were assessed by a reader who was blinded to whether the study had been performed before or after ablation. As shown in Figure 1, the superoinferior and anteroposterior diameters of each PV were assessed in 8 mm to 10 mm-thick slices of 2 long-axis MIP (maximum intensity projection) PV images (oblique coronal and oblique axial images) based on the long axis of the PV. The PV ostium was defined as the point of inflection between the left atrium wall and the PV wall. The ostium cross-sectional area was estimated by the formula:

$$\text{Ostium cross-sectional areas} = \pi \times \frac{\text{superoinferior diameter}}{2} \times \frac{\text{anteroposterior diameter}}{2}$$

Baseline and postablation PV cross-sectional areas were assessed at the PV ostium, at 3-mm intervals and at the point of maximal narrowing.

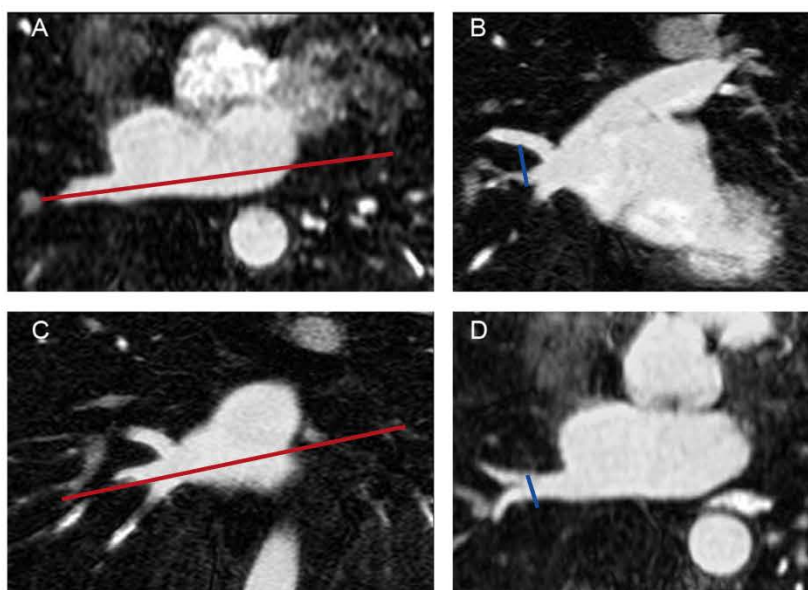
The ostium ellipticity was calculated as follows:

$$\text{Ostium ellipticity} = \frac{(\text{longest diameter} - \text{shortest diameter})}{\text{longest diameter}}$$

This formula results in a value between 0 (circumference) and 1 (straight line). The distance from PV ostium to the first branching and PV angles in reference to the axial and coronal planes of the body were also assessed.

Left atrium diameters (anteroposterior, transversal and longitudinal) and volumes (end-systolic and end-diastolic) were measured.

The MIP and the MPVR (multiprojection volume reconstruction) reformations were performed with the aid of commercial volume-visualization software (Advantage Workstation 4.2; GE Medical Systems).



**Figure 1.** Measurement of pulmonary vein diameters. Long-axis of the pulmonary vein in an axial plane (A). The superoinferior diameter of each pulmonary vein was measured in an oblique coronal image reconstruction (B) based on the plane showed in A. Long axis of the pulmonary vein in a coronal plane (C). The anteroposterior diameter was measured in an oblique axial image (D) based on the plane showed in C. The pulmonary vein ostium was defined as the point of inflection between the left atrium wall and the pulmonary vein wall.

For determination of interobserver agreement, PV measurements were independently carried out by an MRI reader with 15 years' experience. For determination of intraobserver agreement, each study was reread by the initial reader in a blinded fashion after 1 year.

### Pulmonary Vein Stenosis

Pulmonary vein stenosis was defined as a PV diameter narrowing greater than twice the standard deviation of the intraobserver differences. Pulmonary vein stenoses were categorized into concentric (narrowing of both superoinferior and anteroposterior diameters) or eccentric (narrowing of one diameter). Depending of the degree of reduction in the PV cross-sectional area, PV stenoses were categorized as mild (< 50%), moderate (50% to 70%), or severe (> 70%).

### Statistical Analysis

Continuous variables did not follow a normal distribution according to the Shapiro-Wilk's test, and thus they are presented as median [interquartile range] and were compared with the Mann-Whitney U test. Categorical variables were compared using the chi-square test. Generalized estimating equations analysis was performed to identify clinical and anatomical predictors of PV postablation stenosis. Unlike conventional logistic regression, which uses the assumption of independent cases, the method used here (generalized estimating equations) takes into account that cases are correlated (measurements of several veins within each patient), which yields more reliable odds ratio estimations. Clinically relevant variables (age, sex, hypertension, structural heart disease, and type of AF) and morphometric variables potentially associated with luminal loss after ablation (left atrium volumes, type of PV, PV ostial area, PV ostial ellipticity, PV angulation, and distance to the first branching) were tested in the multivariate analysis. All

variables were initially included in the model and then a stepwise backward selection of variables was done with the *P* value set at .25 for entering and .10 for exclusion. Intraclass correlation coefficient analysis was carried out to assess the inter- and intraobserver reproducibility of measurements. The Fleiss categories describe the strength of agreement: > 0.75 = high agreement; 0.41-0.75 = moderate agreement; < 0.40 = poor agreement. Data analyses were performed using JMP software (7.0) and SPSS (19.0) with a 2-sided significance level of 0.05.

### RESULTS

The baseline characteristics of the study population are included in Table 1. A total of 304 PVs were targeted in 80 patients. We achieved PV bidirectional block in all targeted PVs. There were complications associated with the ablation in 5 of 80 patients (6.3%) (femoral arteriovenous fistula in 2 patients, femoral hematoma in 1 patient, air embolism with normal coronariography in 1 patient and mitral tendinous cord lesion in 1 patient).

### Pulmonary Vein Anatomy

The classical pattern of 4 single PVs was present in 51 of 80 patients (64%); 15 of 80 (19%) had a left common trunk, 17 of 80 (21%) had an independent right middle PV and 3 of 80 (4%) had a left common trunk and an independent right middle PV simultaneously. As shown in Table 2, right-sided PV ostia were larger and rounder than left-sided PV ostia ( $P < .001$  for both comparisons). Inferior PVs were smaller than superior PVs (inferior PVs ostia area: 182 [141-227] mm<sup>2</sup> vs superior: 215 [188-247] mm<sup>2</sup>;  $P < .001$ ) and were more oval (inferior PVs ellipticity: 0.16 [0.07-0.28], vs superior PVs ellipticity: 0.09 [0.04-0.17];  $P < .001$ ). The most elliptical and smallest ostia of the 4 PVs were seen in the left inferior PV ( $P < .001$  for both comparisons). The right superior PV showed the roundest and largest ostia but this difference was not statistically significant. The longest distance between the PV



**Table 1**  
Characteristics of the Study Population

Age, years	54 [47-60]
Sex,	
Male	66 (82.5)
Female	14 (17.5)
Arterial hypertension	28 (35)
Structural heart disease	14 (18)
Ischemic	4 (5)
Hypertensive	4 (5)
Tachycardiomyopathy	3 (3.8)
Valvular	1 (1.3)
Dilated	1 (1.3)
Congenital	1 (1.3)
Atrial fibrillation type	
Paroxysmal	54 (68)
Persistent	26 (32)
Antiarrhythmic drugs previous to ablation	68 (85)

Data are expressed as No. (%), or median [interquartile range].

ostium and the first branching was found at the left superior PV ( $P < .001$ ) and the shortest at the right inferior PV ( $P < .001$ ). This distance was greater at the left-sided veins than at the right-sided veins (media of the difference, 8.7 mm; 95% confidence interval, 7.5-9.9;  $P < .001$ ).

Univariate analysis showed larger ostia in men (men: 209 [173-241] mm<sup>2</sup> vs women: 185 [143-216] mm<sup>2</sup>;  $P = .002$ ), in patients with hypertension (214 [173-246] mm<sup>2</sup> vs 198 [161-233] mm<sup>2</sup>;  $P = .05$ ), structural cardiomyopathy ( $P = .03$ ), persistent AF (222 [180-258] mm<sup>2</sup> vs 194 [161-230] mm<sup>2</sup>;  $P < .001$ ), and larger left atrium size. Multiple regression analysis revealed that only left atrium size was an independent predictor of PV size.

### Pulmonary Vein Stenosis

The intraclass correlation coefficient was 0.96 for intraobserver reproducibility and 0.85 for interobserver variability in PV diameter measurement (high agreement according to Fleiss' categories). The standard deviation of the intraobserver and interobserver differences was 1.625 mm, without differences in superoinferior and anteroposterior diameters. Thus, PV stenosis was defined as narrowing of any PV diameter (superoinferior or anteroposterior)  $> 3.25$  mm.

Overall, there was a median reduction of 32 mm<sup>2</sup> [7.7-57.7 mm<sup>2</sup>] in PV ostial area after ablation (Figure 2). This reduction was not associated with changes in left atrium volume.

**Table 2**  
Pulmonary Vein Morphometrics

	Area, mm <sup>2</sup>	Ellipticity	Distance to first branching, mm
<i>Right PVs</i>			
RIPV	223 [187-257] (120-448)	0.09 [0.04-0.15] (0.00-0.48)	10 [7-13] (2-34)
RSPV	220 [180-244] (120-362)	0.10 [0.06-0.18] (0.00-0.48)	9 [6-12] (3-18)
<i>Left PVs</i>			
LIPV	227 [199-269] (131-448)	0.08 [0.03-0.12] (0.00-0.30)	12 [8-15] (2-34)
LSPV	177 [138-211] (63-388)	0.20 [0.09-0.30] (0.00-0.55)	19 [16-23] (8-36)
RMPV	141 [113-178] (63-330)	0.28 [0.17-0.35] (0.00-0.55)	17 [14-20] (8-31)
LCT	198 [177-234] (87-388)	0.11 [0.05-0.22] (0.01-0.38)	21 [18-26] (9-36)
	61 [45-75] (33-116)	0.09 [0.05-0.16] (0.01-0.25)	9 [5-12] (1-22)
	355 [292-438] (216-589)	0.34 [0.30-0.42] (0.00-0.56)	22 [19-24] (11-28)

LCT, left common trunk; LIPV, left inferior pulmonary vein; LSPV, left superior pulmonary vein; PVs, pulmonary veins; RIPV, right inferior pulmonary vein; RSPV, right superior pulmonary vein; RMPV, right middle pulmonary vein.  
Data are expressed as [interquartile range] (range).

A PV stenosis was observed in 78 out of the 322 analyzed veins (24.2%). The stenosis was mild in 66 of 78 PVs (84.6%), moderate in 11 of 78 veins (14.1%), and severe in 1 of 78 veins (1.3%) (Figure 3A). All patients with PV stenosis were asymptomatic and none required treatment. The greatest rate of stenosis was seen in the left inferior PV (24 of 65). Indeed, the only severe stenosis was identified in a left inferior PV (cross-sectional area reduction percentage of 78%), as shown in Figures 3B-D.

The PV stenosis was excentric in 58 PVs (74%) and concentric in 20 (26%). No difference was found in the frequency of reduction of superoinferior or anteroposterior diameters. The ratio excentric to concentric PV stenosis was similar in all PVs. Most of the moderate stenosis (8 of 78, 73%) and the single case of severe stenosis were concentric while most of the mild cases of stenosis (55 of 66, 83%) were excentric ( $P < .001$ ).

A multiple regression model including clinical factors and morphometric characteristics of PVs and left atrium revealed that a left inferior PV type of PV (odds ratio = 3.089, 95% confidence interval, 1.229-7.757;  $P = .02$ ) and greater preablation ostia cross-sectional area (odds ratio = 1.009, 95% confidence interval, 1.004-1.015 per 1 mm<sup>2</sup> increase;  $P < .001$ ) were independent predictors of PV stenosis (Table 3). Older age (odds ratio = 1.033, 95% confidence interval, 0.998-1.068 per 1 year older) showed a very strong trend to statistical significance ( $P = .06$ ).

## DISCUSSION

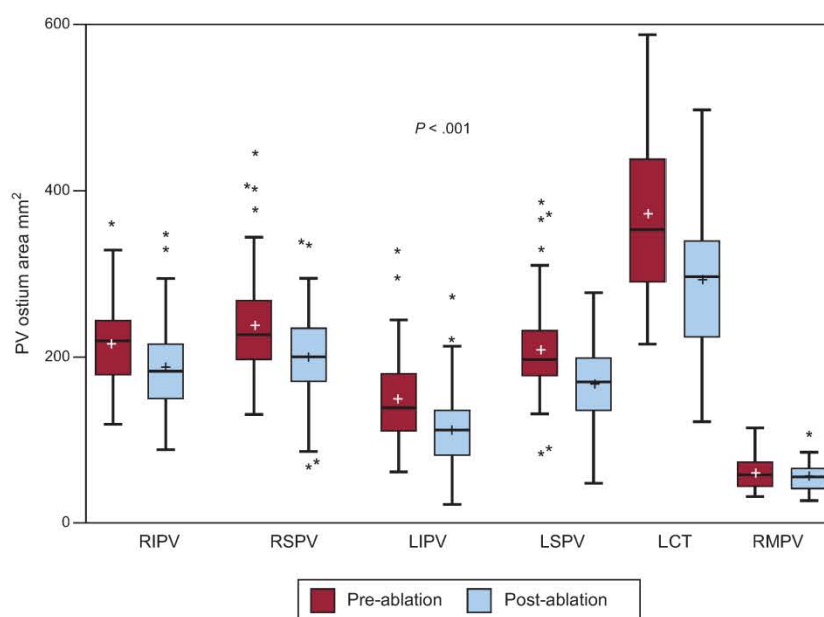
### Anatomical Imaging Techniques

Our results show that MRI performed before catheter ablation of the PVs in patients with AF can be useful not only for the assessment of the number, position, and size of the venous ostia but also to predict the risk of postradiofrequency ablation stenosis.

Computed tomography and MRI are good techniques to assess PV anatomy.<sup>2,8,17,18</sup> Information provided by preablation MRI is very helpful for interventional cardiologists as it allows them not only to select an appropriate catheter but also to ascertain that all PV ostia are evaluated during the procedure. Assessment of these features at conventional angiography may be suboptimal, as only the superior and inferior borders of the PV ostia are displayed.

### Morphometric Characterization of Pulmonary Veins and Atria

Our findings regarding anatomical pattern, size and shape of PVs are in agreement with most previous studies using computed tomography or MRI.<sup>17,19-23</sup> However, our diameter measurements in patients from south-western Europe are slightly below those reported in patients from North America and central Europe.



**Figure 2.** Pre- and postablation pulmonary vein ostium area. Box-plot graphs showing the difference between pulmonary vein cross-sectional areas before and after ablation. LCT, left common trunk; LIPV, left inferior pulmonary vein; LSPV, left superior pulmonary vein; PV, pulmonary vein; RIPV, right inferior pulmonary vein; RMPV, right middle pulmonary vein; RSPV, right superior pulmonary vein. Boxes represent the median [interquartile range]. Whiskers show the minimum and maximum values, except when an outlier value is found, which is depicted as a point. Mean is displayed as “+”.

Consistent with a recent large study,<sup>19</sup> PV ostia were larger in our patients with persistent AF. Other studies found no differences between the 2 groups.<sup>2,8,22</sup> However, in our study this association lost statistical significance when adjusted by left atrium volume, suggesting that the enlargement of PV is a process linked to the enlargement of the left atrium as a consequence of the atrial remodelling that occurs in these patients.

### Incidence of Stenosis

The true incidence of postablation PV stenosis remains uncertain as percentages from 0% to 42.4% have been reported.<sup>15,16,24–26</sup> We found mild stenosis in 66 out of the 322 analyzed veins (20.5%), moderate stenosis in 11 of 322 veins (3.4%), and severe stenosis in 1 of 322 veins. Among the possible causes of these differences are the criteria for definition of stenosis (eg, measurement of 1 diameter vs only cross-sectional area or considering stenosis only when reduction > 50%), different diagnostic methods and diverse ablation techniques.

### Preablation Predictors for Stenosis

Older patients, those with larger PV ostia and the left inferior PVs had a higher risk of postablation PV stenosis. Although technical ablation factors such as number, time, temperature, and power of applications in the PVs are involved in stenosis,<sup>7,27,28</sup> little is known about morphometric predictors of stenosis.

Regarding age, a higher frequency of discontinuity and hypertrophy and a higher degree of fibrosis of the atrial myocardium have been reported in the PVs of patients with AF<sup>29</sup> and in older patients.<sup>30</sup> We believe that the additional fibrosis induced by radiofrequency applications in these potentially pathological PVs in aged patients could further contribute to stenosis.

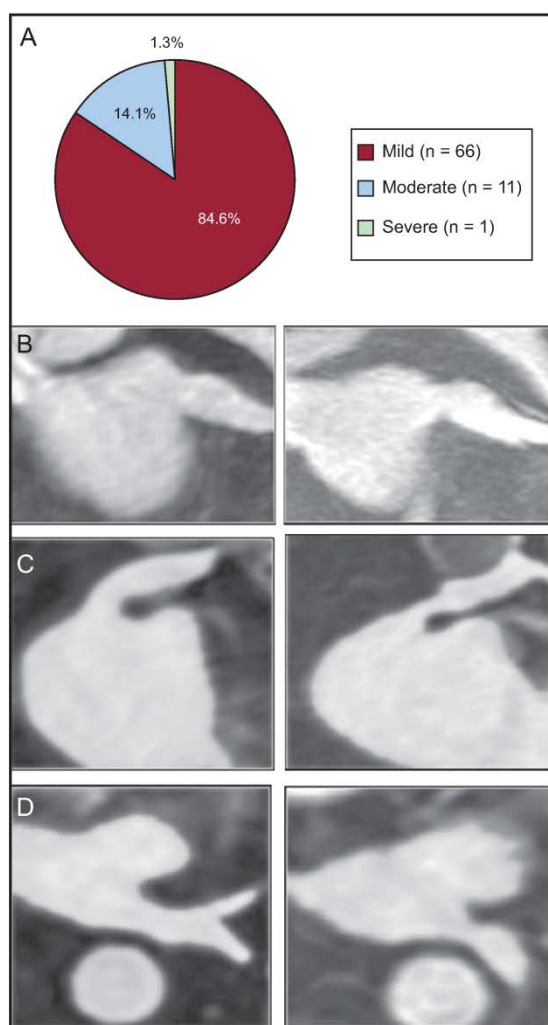
Additionally, large preablation PV ostia were found to be a predictor for stenosis in this study. Several factors may be involved in this seemingly surprising result: a) enlarged PVs usually need more applications to be isolated, and b) the operator, consciously or not, may have been less conservative when ablating enlarged PVs. Consistent with our data, PV size (larger) has been described as a predictor of stenosis.<sup>14</sup>

Finally, as shown by previous studies,<sup>27,31</sup> most stenoses occurred at the left inferior PV. However, as far as we know, this has not previously been reported to be an MRI predictor of stenosis. The oval shape of most left inferior PV ostia may contribute to prolonged contact of the ablation catheter with the anterior and posterior walls of the PV, which can lead to a more extensive ablation than intended. In fact, most of the moderate and severe stenosis observed in left inferior PVs showed a greater reduction in the anteroposterior diameter.

### Limitations

The main limitation of our study was that postablation MRI was obtained after a median of 95 days; therefore, measurements might vary in a longer-term evaluation. Also, cardiac MRIs were performed with 1 T or 1.5 T systems, which is not state-of-the-art technology. However, these are the systems used in the clinical practice in most hospitals worldwide. Additionally, these systems allow 1.5 mm × 1.25 mm × 1.78 mm voxel resolutions to be achieved, which is more than enough to accomplish the aims of this study. Note that we have only considered as stenosis reductions over 3.25 mm (twice the standard deviation of intraobserver variability), which is around twice the resolution of the technique at any dimension, so it is not an important limiting factor. Finally, computed tomography imaging techniques would have provided better resolutions but at an added cost of radiating the patient twice (pre- and postablation).





**Figure 3.** Pulmonary vein stenosis. A: frequency of stenosis according to the cross sectional area reduction percentage (mild < 50%; moderate: 50–70%; severe: > 70%). B–D: gadolinium enhanced 3-dimensional magnetic resonance imaging sequence reformations. B: mild stenosis of a left superior pulmonary vein, oblique coronal plane. C: moderate stenosis of a left superior pulmonary vein, oblique coronal plane. D: severe stenosis of a left inferior pulmonary vein, axial plane.

**Table 3**  
Predictors of Postablation Stenosis

	OR (95%CI)	P
Age	1.033 (0.998–1.068)	.06
Persistent AF	1.986 (0.776–5.085)	.15
Pre-ablation LAESV	0.988 (0.972–1.003)	.12
PV		< .001
RIPV	0.279 (0.100–0.778)	.01
RSPV	0.721 (0.031–1.679)	.45
LIPV	3.089 (1.229–7.757)	.02
RMPV	Non estimable	–
LCT	0.679 (0.124–3.723)	.65
Preablation ostial area	1.009 (1.004–1.015)	< .001

95%CI, confidence interval; AF, atrial fibrillation; LAESV, left atrial end-systolic volume; LCT, left common trunk; LIPV, left inferior pulmonary vein; OR, odds ratio; PV, pulmonary vein; RIPV, right inferior pulmonary vein; RMPV, right middle pulmonary vein; RSPV, right superior pulmonary vein.

## CONCLUSIONS

After ablation, PV luminal loss is seen, but stenosis is detected in less than one third of patients. Most cases of stenosis are mild, with severe stenosis being rare. Older patients, those with larger PV ostia and left inferior PVs are more likely to develop postablation stenosis.

## FUNDING

Jorge G. Quintanilla was supported by ERDF (European Regional Development Fund) and Instituto de Salud Carlos III: RD06/0003/0009 (REDINSCOR [Red Española de Insuficiencia Cardíaca]) and RD12/0042/0036 (RIC [Red de Investigación Cardiovascular]).

## CONFLICTS OF INTEREST

None declared.

## REFERENCES

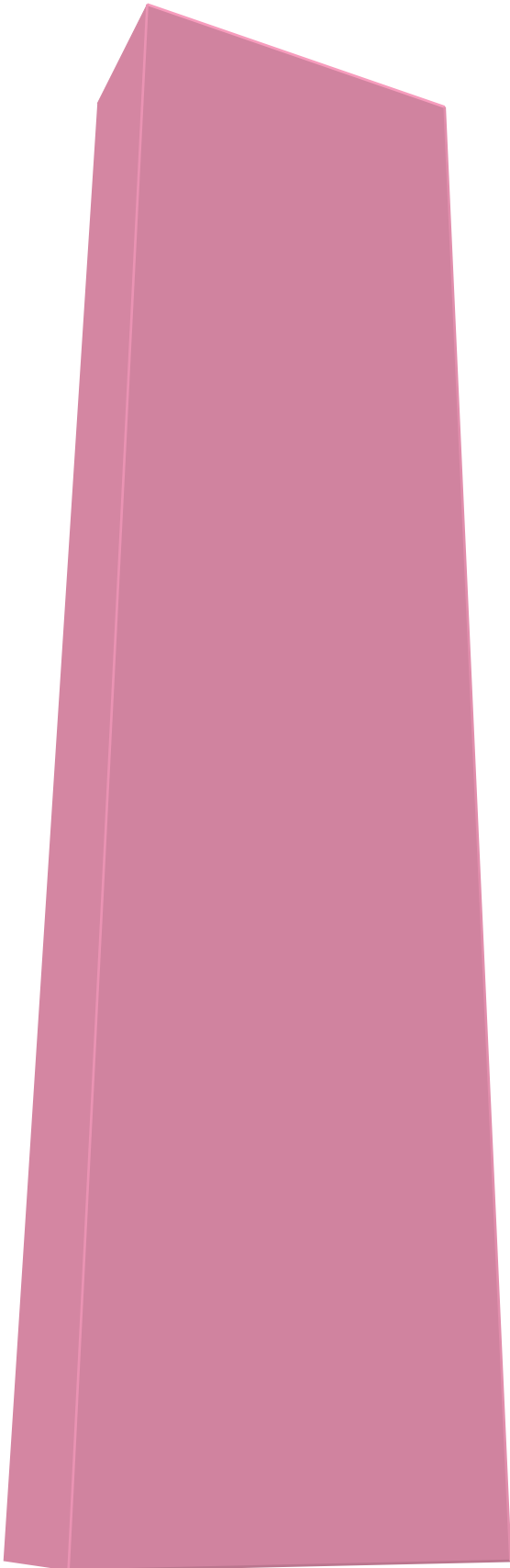
- Beukema WP, Elvan A, Sie HT, Misier AR, Wellens HJ. Successful radiofrequency ablation in patients with previous atrial fibrillation results in a significant decrease in left atrial size. *Circulation*. 2005;112:2089–95.
- Schwartzman D, Lacomis J, Wigginton WG. Characterization of left atrium and distal pulmonary vein morphology using multidimensional computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1349–57.
- Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*. 1998;339:659–66.
- Katritsis D, Merchant FM, Mela T, Singh JP, Heist EK, Armondas AA. Catheter ablation of atrial fibrillation: the search for substrate-driven end points. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:2293–8.
- Cappato R, Calkins H, Chen SA, Davies W, Iesaka Y, Kalman J, et al. Worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation. *Circulation*. 2005;111:1100–5.
- Haissaguerre M, Shah DC, Jais P, Hocini M, Yamane T, Deisenhofer I, et al. Electrophysiological breakthroughs from the left atrium to the pulmonary veins. *Circulation*. 2000;102:2463–5.
- Arentz T, Jander N, Von Rosenthal RJ, Blum T, Furmaier R, Görnandt L, et al. Incidence of pulmonary vein stenosis 2 years after radiofrequency catheter ablation of refractory atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2003;24:963–9.
- Kato R, Lickfett L, Meininger G, Dickfeld T, Wu R, Juang G, et al. Pulmonary vein anatomy in patients undergoing catheter ablation of atrial fibrillation: lessons learned by use of magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003;107:2004–10.
- Saad EB, Rossillo A, Saad CP, Martin DO, Bhargava M, Erciyes D, et al. Pulmonary vein stenosis after radiofrequency ablation of atrial fibrillation: functional characterization, evolution, and influence of the ablation strategy. *Circulation*. 2003;108:3102–7.
- Oral H, Knight BP, Tada H, Ozaydin M, Chugh A, Hassan S, et al. Pulmonary vein isolation for paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation*. 2002;105:1077–81.
- Pappone C, Oreto G, Rosanio S, Vicedomini G, Tocchi M, Gugliotta F, et al. Atrial electroanatomic remodeling after circumferential radiofrequency pulmonary vein ablation: efficacy of an anatomic approach in a large cohort of patients with atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;104:2539–44.
- Mulder AA, Wijffels MC, Wever EF, Boersma LV. Pulmonary vein anatomy and long-term outcome after multi-electrode pulmonary vein isolation with phased radiofrequency energy for paroxysmal atrial fibrillation. *Europace*. 2011;13:1557–61.
- Anselme F, Gahide G, Savoure A, Gerbaud E, Mabru M, Cribier A, et al. MR evaluation of pulmonary vein diameter reduction after radiofrequency catheter ablation of atrial fibrillation. *Eur Radiol*. 2006;16:2505–11.
- Dong J, Vasamreddy CR, Jayam V, Dalal D, Dickfeld T, Eldadah Z, et al. Incidence and predictors of pulmonary vein stenosis following catheter ablation of atrial fibrillation using the anatomic pulmonary vein ablation approach: results from paired magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2005;16:845–52.
- Barrett CD, Di BL, Natale A. How to identify and treat patient with pulmonary vein stenosis post atrial fibrillation ablation. *Curr Opin Cardiol*. 2009;24:42–9.
- Chen LY, Shen WK. Epidemiology of atrial fibrillation: a current perspective. *Heart Rhythm*. 2007;4:S1–6.
- Jongbloed MR, Dirksen MS, Bax JJ, Boersma E, Geleijns K, Lamb HJ, et al. Atrial fibrillation: multi-detector row CT of pulmonary vein anatomy prior to radiofrequency catheter ablation—initial experience. *Radiology*. 2005;234:702–9.
- Kim YH, Marom EM, Herndon JE, McAdams HP. Pulmonary vein diameter, cross-sectional area, and shape: CT analysis. *Radiology*. 2005;235:43–9.

19. Anselmino M, Blandino A, Beninati S, Rovera C, Boffano C, Belletti M, et al. Morphologic analysis of left atrial anatomy by magnetic resonance angiography in patients with atrial fibrillation: a large single center experience. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2011;22:1-7.
20. Den Uijl DW, Tops LF, Delgado V, Schuijff JD, Kroft LJ, De RA, et al. Effect of pulmonary vein anatomy and left atrial dimensions on outcome of circumferential radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2011;107:243-9.
21. Dill T, Neumann T, Ekinici O, Breidenbach C, John A, Erdogan A, et al. Pulmonary vein diameter reduction after radiofrequency catheter ablation for paroxysmal atrial fibrillation evaluated by contrast-enhanced three-dimensional magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003;107:845-50.
22. Mansour M, Holmvang G, Sosnovik D, Migrino R, Abbara S, Ruskin J, et al. Assessment of pulmonary vein anatomic variability by magnetic resonance imaging: implications for catheter ablation techniques for atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2004;15:387-93.
23. Wittkamp FH, Vonken EJ, Derksen R, Loh P, Velthuis B, Wever EF, et al. Pulmonary vein ostium geometry: analysis by magnetic resonance angiography. *Circulation*. 2003;107:21-3.
24. Calvo N, Nadal M, Berrueto A, Andreu D, Arbelo E, Tolosana JM, et al. Evolución de la mejora en los resultados y las complicaciones de la ablación por catéter de la fibrilación auricular: aprendizaje, técnicas y metodología. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65:131-8.
25. Martí-Almor J, Bazan V, Vallès E, Benito B, Jauregui-Abularach ME, Bruguera-Cortada J. Resultados a largo plazo de la crioablación con balón para el tratamiento de la fibrilación auricular en un centro de bajo volumen. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67:577-8.
26. Moya A, Sancho-Tello MJ, Arenal A, Fidalgo ML, Brugada R, Martínez Ferrer J, et al. Novedades en alteraciones del ritmo cardíaco: electrofisiología cardíaca, arritmias y estimulación cardíaca. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:116-23.
27. Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Garrigue S, Takahashi A, Lavergne T, et al. Electrophysiological end point for catheter ablation of atrial fibrillation initiated from multiple pulmonary venous foci. *Circulation*. 2000;101:1409-17.
28. Kok LC, Everett TH, Akar JG, Haines DE. Effect of heating on pulmonary veins: how to avoid pulmonary vein stenosis. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:250-4.
29. Hassink RJ, Aretz HT, Ruskin J, Keane D. Morphology of atrial myocardium in human pulmonary veins: a postmortem analysis in patients with and without atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1108-14.
30. Ho SY, Cabrera JA, Tran VH, Farré J, Anderson RH, Sánchez-Quintana D. Architecture of the pulmonary veins: relevance to radiofrequency ablation. *Heart*. 2001;86:265-70.
31. Tintera J, Porod V, Cihák R, Mlcochová H, Rolencová E, Fendrych P, et al. Assessment of pulmonary venous stenosis after radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation by magnetic resonance angiography: a comparison of linear and cross-sectional area measurements. *Eur Radiol*. 2006;16:2757-67.



## Apéndice C

# Proyectos Fin de Master dirigidos por el doctorando







# Sistema de cartografiado óptico en corazones grandes perfundidos con sangre: registro simultáneo de potenciales transmembrana y transitorios de calcio, mediante un único fotodetector CCD

Carolina Curiel Llamazares<sup>1</sup>, Felipe Alonso Atienza<sup>2</sup>, Jorge G. Quintanilla<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Unidad de Arritmias, Instituto Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España. <sup>2</sup> Departamento de Teoría de la Señal y Comunicaciones. Universidad Rey Juan Carlos. Fuenlabrada, Madrid. España.

**Resumen**— El cartografiado óptico (CO) es una herramienta muy útil para el registro de la actividad eléctrica del corazón con alta resolución espaciotemporal. Los sistemas clásicos permiten el registro separado de potenciales transmembrana ( $V_m$ ) o transitorios de calcio ( $Ca_iT$ ) con un único fotodetector (p.e. cámara CCD), o el registro simultáneo de ambos parámetros a costa de utilizar dos fotodetectores y un complejo sistema óptico auxiliar. El presente proyecto aborda el diseño y la implementación de un sistema de CO, que como novedad, permite la adquisición simultánea de  $V_m$  y  $Ca_iT$  en corazones grandes utilizando un único fotodetector y aprovechando los cortos tiempos de conmutación de la tecnología de iluminación LED. Dicho sistema ha sido diseñado para la utilización de tintes que emiten en el infrarrojo cercano, permitiendo trabajar con corazones perfundidos con sangre en vez de Tyrode, lo que minimiza el edema. Además, se ha implementado una aplicación en MATLAB® que permite el control de dicho sistema con una interfaz gráfica que posibilita la adquisición de películas multiplexadas, la demultiplexación de los  $V_m$  y  $Ca_iT$ , la realización de filtrados espaciotemporales, la visualización de las películas y de los  $V_m$  y  $Ca_iT$  registrados en cada píxel y la exportación/importación de las películas en varios formatos. Por otra parte, se ha cuantificado la calidad de las películas de  $V_m$  y  $Ca_iT$  obtenidas con diferentes perfusiones y tasas de adquisición. Por último, se discuten los potenciales cambios realizables en el sistema para mejorar la calidad de los registros obtenidos.

**Palabras clave**— Cartografiado óptico cardíaco; Potencial de acción; Transitorio de calcio.

## I. INTRODUCCIÓN

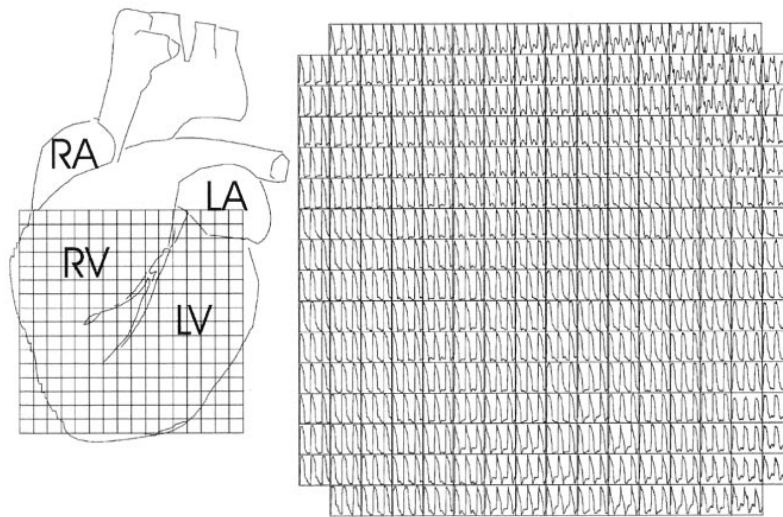
EL Cartografiado Óptico (CO) es una técnica de investigación experimental que se utiliza en electrofisiología cardíaca para analizar, a través de una serie de señales/parámetros de interés, el comportamiento eléctrico del corazón tanto en situaciones normales como patológicas

[1]. El CO consiste en el registro, mediante una cámara de alta sensibilidad y alta tasa de adquisición de imágenes (típicamente cámaras CCD o CMOS especializadas), de la fluorescencia emitida por tintes fotosensibles adheridos a la membrana de las células del corazón. Para cada píxel de la imagen (dimensión espacial) se obtiene una señal (dimensión temporal) de fluorescencia (Figura 1A) que está relacionada con algún parámetro electrofisiológico de interés, siendo los más típicos los potenciales de acción transmembrana ( $V_m$ ) y los transitorios de calcio intracelular ( $Ca_iT$ ). Con las señales anteriores pueden calcularse otros parámetros informativos a partir de mapas de activación, de velocidades locales de conducción y de repolarización [2], entre otros (Figura 1B).

El alcance de los sistemas de CO con una única cámara ha estado limitado a la captación de registros uniparamétricos ( $V_m$  o  $Ca_iT$ ). Por otro lado, desde hace unos 10 años se han utilizado sistemas de CO que permiten el registro simultáneo de 2 parámetros electrofisiológicos simultáneos (típicamente  $V_m$  y  $Ca_iT$ ) [3]. Sin embargo, su complejidad técnica y los altos costes asociados (dos cámaras muy caras, sistemas ópticos auxiliares complejos con espejos dicróicos, alineamiento y sincronización de alta precisión a priori entre las cámaras, etc.), han impedido la generalización de su uso como una herramienta de investigación estándar hasta el momento [4].

Recientemente las limitaciones de los sistemas de CO con una sola cámara se han visto solventadas gracias a los avances obtenidos en las tecnologías de iluminación y de adquisición [4], así como en los tintes fotosensibles [5]. Las tasas de adquisición (imágenes por segundo) de las nuevas cámaras CCD y CMOS permiten obtener registros multiparamétricos con una alta resolución espacio-temporal utilizando un único detector. Para excitar los diferentes tintes fotosensibles utilizados (uno por cada parámetro a medir) a altas velocidades, es necesario utilizar fuentes de luz capaces de

A



B

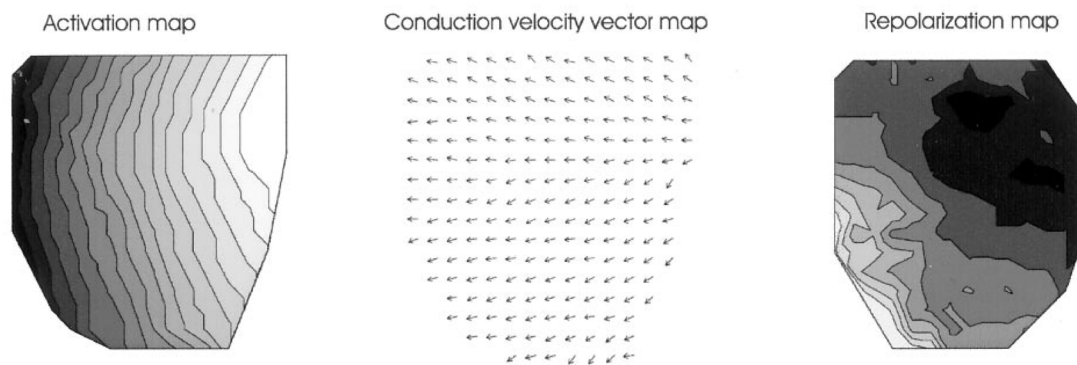


Figura.1 A: Mapas de potenciales de acción: diagrama esquemático del epicardio anterior en corazón de cobaya y el campo de visión de la imagen. B: Mapas de activación, de vectores de velocidad de conducción y repolarización. Figura obtenida de “Optical imaging of the heart” [2].

conmutar rápidamente ( $\sim 1$  ms) entre diferentes longitudes de onda, siendo los sistemas de iluminación LEDs los más apropiados para este fin [4]. Esto ha permitido, muy recientemente, obtener CO de múltiples parámetros electrofisiológicos simultáneos (por ejemplo  $V_m$  y  $Ca_iT$ ) con una única cámara [4]. Gracias a ello, ahora es posible realizar un estudio más exhaustivo de los mecanismos subyacentes en la generación del ritmo tanto en condiciones normales como fisiopatológicas, sin necesidad de usar dos cámaras.

Basándonos en un sistema de CO propuesto recientemente para corazón de roedor [4], en el presente proyecto se ha diseñado e implementado un sistema de CO cardíaco que permite el registro simultáneo de los  $V_m$  y  $Ca_iT$  en corazones grandes (cerdo, perro, oveja e incluso humano), utilizando una única cámara CCD y cuatro fuentes de iluminación LED (a dos longitudes de onda diferentes), además de los filtros ópticos y tintes fotosensibles apropiados. Si se desea, dicho sistema permite además la utilización de sangre en lugar de solución de perfusión transparente (Tyrode), ya que utiliza longitudes de onda en el infrarrojo cercano que son menos absorbidas por la hemoglobina que las de los sistemas clásicos de CO. La

utilización de sangre posibilita modelos más realistas, con la ventaja adicional de limitar de manera muy importante la edematización del corazón bajo estudio, permitiendo experimentos de mayor duración con el corazón en condiciones óptimas.

A continuación se realiza un repaso al **estado del arte de los sistemas de CO** para facilitar la comprensión de las secciones posteriores del presente trabajo fin de máster.

#### A. Esquema básico y funcionamiento [6].

A la hora de realizar CO cardíaco existen diferentes esquemas de montaje. Sin embargo, todos tienen en común una serie de componentes principales.

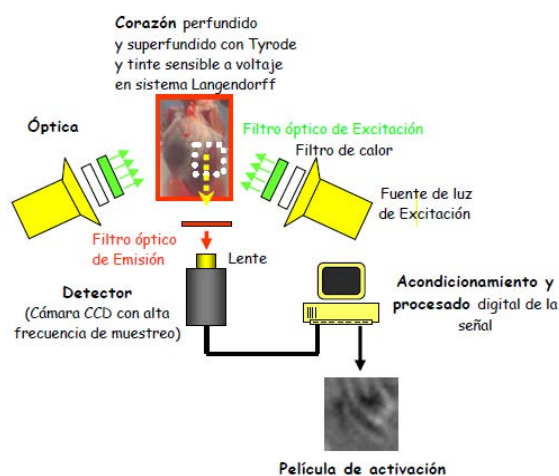
En primer lugar, todos los sistemas deben mantener vivo al corazón sometido a estudio. Para ello, el corazón debe ser conectado rápidamente a un sistema de perfusión Langendorff, tras haber sido extraído *in vivo*. Este sistema permite la circulación de una solución nutritiva (Tyrode o incluso la propia sangre del animal) enriquecida con oxígeno hacia las células cardíacas a través de las arterias coronarias. Una vez que el corazón está conectado al sistema de perfusión, éste se

introduce en un recipiente transparente habitualmente lleno de la misma solución con la que está perfundido, a unos 37°C y se desfibrila. Después de esto, el corazón comienza a latir de manera similar a como lo haría *in vivo*.

A la preparación se le añade un tinte fotosensible, el cual es excitado con una luz a una determinada longitud de onda y emite fotones a otra longitud de onda diferente. Para la excitación de las moléculas de tinte es necesario utilizar una o varias fuentes de luz. Si las fuentes emiten mucho calor, es conveniente acoplarles filtros de calor para que no aumente la temperatura de la preparación cardíaca. Además, es indispensable acoplar a estas fuentes un filtro óptico que sólo deje pasar el rango de longitudes de onda de excitación apropiado para las moléculas del tinte fotosensible (filtro de excitación).

La luz emitida por el tinte que hay en las células cardíacas, atraviesa un filtro óptico acoplado a la cámara (filtro de emisión) que sólo deja pasar el rango de longitudes de onda emitidas por el tinte, hacia una lente situada sobre el fotodetector y que está enfocada a la zona de interés del corazón. Por último, dicho fotodetector transforma la señal óptica a una señal eléctrica que es enviada hacia un ordenador, donde posteriormente será procesada.

En la **Figura 2** se representa el montaje típico para CO cardíaco. Dicho montaje utiliza dos fuentes emisoras de luz, cada una de ellas con un filtro de calor, y un filtro óptico de excitación, que sólo deja pasar la luz de un determinado rango de longitudes de onda para excitar el tinte sensible al voltaje, el cual está adherido a las células cardíacas. La fluorescencia emitida por el corazón es filtrada en el margen de longitudes de onda apropiadas mediante un filtro óptico de emisión, y llega a un detector que, en este ejemplo, consiste en una cámara CCD con alta tasa de adquisición de imágenes.



**Figura 2.** Montaje típico de cartografiado óptico cardíaco. Consta de dos fuentes de luz, con sus respectivos filtros de calor y filtros ópticos de excitación. La luz emitida por el corazón pasa a través de un filtro óptico de emisión, el cual sólo deja pasar determinado rango de longitudes de onda, y esta luz es entregada a una lente que enfoca la luz captada sobre el fotodetector (sensor CCD o CMOS típicamente).

## B. Tintes potenciométricos y tintes sensibles al calcio.

Existen una gran variedad de tintes fotosensibles, cuyas moléculas están compuestas por un cromóforo que se adhiere a la membrana de las células y desprende fotones cuando se produce un cambio en la célula (por ejemplo, un cambio en el potencial de membrana o en la concentración de calcio intracelular) mientras que es excitada con una determinada luz.

Puesto que en el presente proyecto se desean registrar simultáneamente los  $V_m$  y los  $Ca_iT$ , a continuación se exponen los tipos de tintes potenciométricos y tintes sensibles al calcio intracelular más utilizados en los sistemas clásicos de CO.

### 1) Tintes potenciométricos.

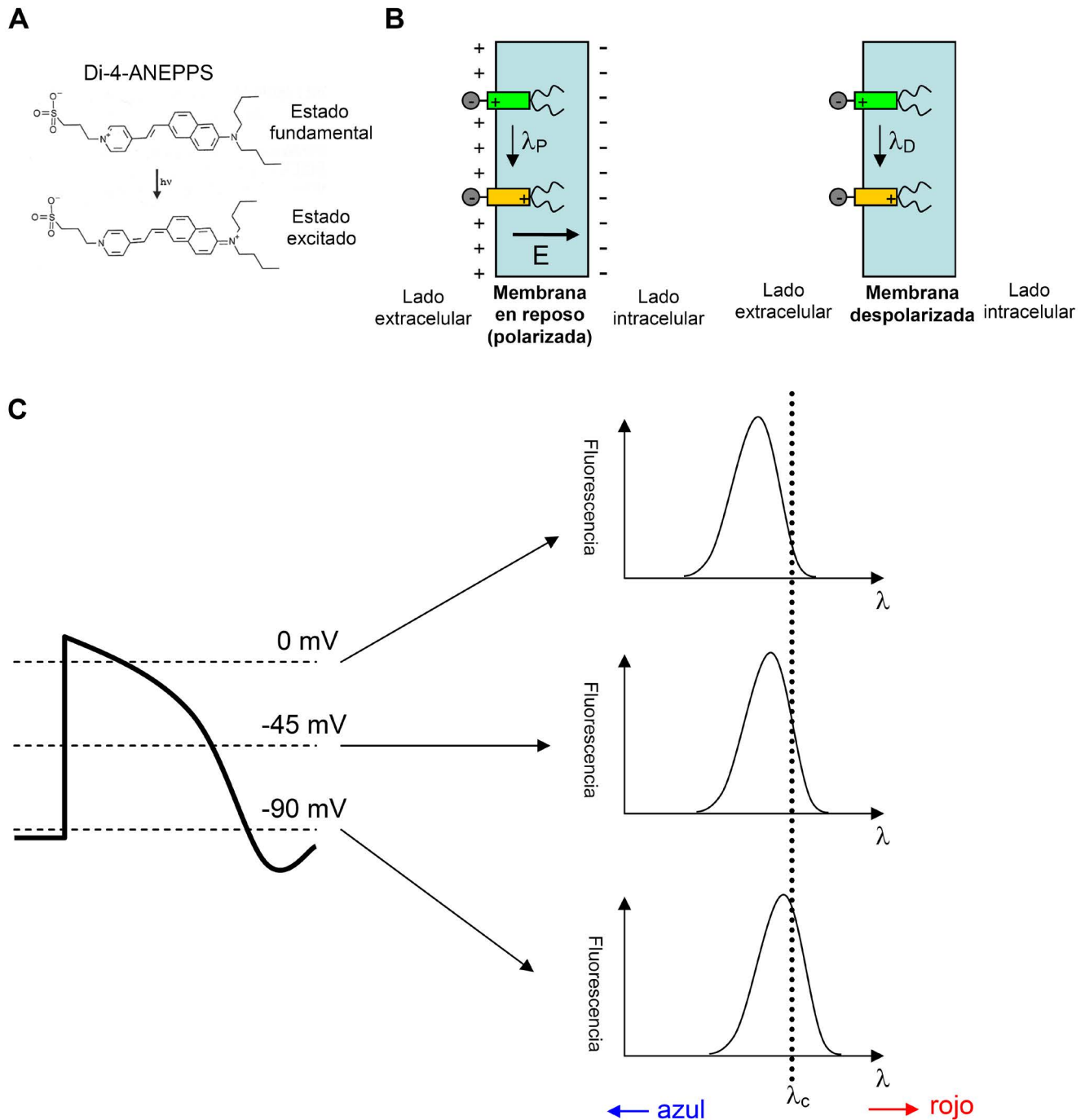
Los tintes potenciométricos son sensibles a los cambios de potencial transmembrana ( $V_m$ ) en las células cardíacas. Típicamente los más utilizados han sido el di-4-ANEPPS y el di-8-ANEPPS. Estos tintes son sensibles a variaciones temporales de voltaje en el orden de microsegundos, produciéndose un cambio uniforme del ~10% de la fluorescencia por cada 100 mV. Su mecanismo de funcionamiento se explica en la **Figura 3**. El tinte di-4-ANEPPS tiene el inconveniente de que se internaliza rápidamente en las células, ocasionando una disminución de la señal registrada con el paso del tiempo. En cambio, el tinte di-8-ANEPPS se mantiene más tiempo en la capa externa, reduciéndose así la fototoxicidad [7;8].

### 2) Tintes sensibles al calcio.

Los ciclos de calcio, en concreto el  $Ca^{2+}$  intracelular, son de gran importancia para el acoplamiento de estimulo-contracción. Cuando el potencial de acción llega a los -40 mV se abren los canales de calcio, de tal forma que el  $Ca^{2+}$  entra en la célula, provocando una liberación masiva de calcio desde el retículo sarcoplasmático que inicia el mecanismo de contracción celular. En condiciones patológicas, como la insuficiencia cardíaca, existe una desregularización de los transitorios de calcio, contribuyendo a una disfunción de la contractilidad y arritmogénesis [9].

A la hora de elegir un tinte no sólo hay que tener en cuenta las propiedades espectrales del mismo, sino también su afinidad con el  $Ca^{2+}$ . Los tintes con una afinidad alta son los más utilizados, ya que existe una gran variedad de propiedades espectrales, pero tienen el inconveniente de que pueden prolongar artificialmente los transitorios de calcio y confundir la interpretación [10]. En cambio, los tintes de baja afinidad permiten una medición más precisa de la dinámica del calcio pero tienen otros inconvenientes ya que las relaciones señal a ruido obtenidas son algo peores [11]. El Fura-2 y el Indo-1 fueron los primeros tintes de alta afinidad utilizados ampliamente para el estudio del calcio. Ambos requieren de una luz de excitación en el rango ultravioleta (340-380 nm). El mayor inconveniente de estos tintes es la penetración limitada al tejido de la luz ultravioleta [12].





**Figura 3.** Mecanismo electrocrómico de respuesta al potencial de membrana. **A:** El cromóforo de la molécula, sufre un desplazamiento de carga debido a una reorganización de su estructura por el paso del estado fundamental al estado excitado. Es importante destacar que la molécula contiene un grupo polar en un extremo, y cadenas apolares hidrocarbonadas en el otro. Esto permite que la molécula se alinee con la estructura de la membrana de tal forma que el cromóforo quede paralelo al campo eléctrico intramembrana. **B:** Orientación que toma la molécula al ligarse a la membrana celular donde el cromóforo está representado por el rectángulo de color (verde en estado fundamental, naranja en estado excitado). El extremo polar es el círculo gris (que tiene carga negativa), y al otro extremo se representan las cadenas hidrocarbonadas. El campo producido en el interior de la membrana polarizada, disminuye la diferencia de energía entre los estados fundamental y excitado, por lo que se produce un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda mayores (hacia el rojo). **C:** El espectro de emisión de la molécula sensible a voltaje cambia con el potencial de membrana. Cuando la célula se despolariza desde su potencial de reposo (-90 mV) hacia potenciales menos negativos (-45 y 0 mV respectivamente en la figura), el espectro de emisión se desplaza progresivamente hacia longitudes de onda menores (hacia el azul). El filtro de emisión situado delante del detector, excluirá la luz emitida por el tinte por debajo de una cierta longitud de onda  $\lambda_c$ , que aparece representada como una línea vertical punteada. Por ello, la cantidad de luz que alcanza el fotodetector está relacionada con el área de espectro que queda a la derecha de  $\lambda_c$  la cual está directamente relacionada con la tensión transmembrana [6].

Dentro del grupo de tintes de afinidad alta también se encuentran el Fluo-3 (ex. 506 nm / em. 526 nm), Fluo-4 (ex. 494 nm / em. 516 nm) y Rhod-2 (ex. 557 nm / em. 581 nm), los cuales tienen la ventaja de que la luz de excitación necesaria es de longitudes de onda visibles, siendo la atenuación de la luz de excitación/emisión menor [12].

Recientemente se ha desarrollado el tinte de baja afinidad Fura-4F (ex. 340-380 / em. 510 nm), del cual se ha demostrado que genera una señal continua estable en un periodo de 5 a 10 minutos, sin provocar fototoxicidad o *photobleaching* [13].

### C. Fuentes de luz.

La fuente de luz para la excitación de los tintes usados en CO es uno de los elementos del sistema más importantes para obtener una relación señal a ruido lo suficientemente alta. Los métodos de iluminación que han sido más utilizados hasta el momento son las lámparas tungsten-halogen de filamentos y las lámparas de arco de mercurio/xenón, combinadas con filtros de excitación/emisión y dispositivos de control de iluminación.

De entre los dos, las lámparas de tungsten-halogen de filamentos son las fuentes de luz que proporcionan la luz más estable, aunque ofrecen una intensidad de iluminación por unidad de área muy baja y son muy caras. Mientras que las lámparas de arco de mercurio/xenón son inestables, debido a las fluctuaciones del plasma y la dispersión del calor [14].

Actualmente, además de la excitación láser, están en auge las fuentes LEDs, ya que tienen un menor coste, son estables y de fácil uso. Además, permiten una conmutación rápida de longitudes de onda, propiedad muy importante a la hora de registrar múltiples parámetros en CO, como es nuestro caso [4].

### D. Tipos de detectores.

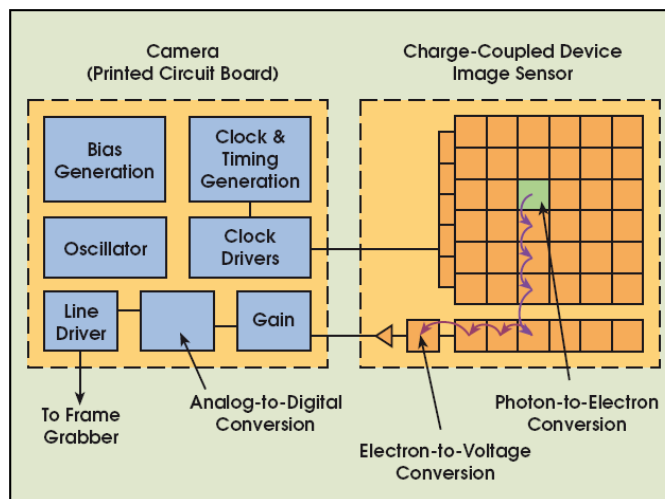
Los fotodetectores son también un elemento clave en un sistema de CO. Actualmente existe un número limitado de fotodetectores que ofrecen una sensibilidad y una resolución espacio-temporal adecuadas para el mapeo cardíaco. Las tecnologías más utilizadas son los arrays de fotodiodos (PDA), tubos fotomultiplicadores (PMT), cámaras CCD (Charge-Coupled Device) y cámaras CMOS (Complementary MetalOxide Semiconductor).

Los PDAs contienen cientos de fotodiodos que son sensores individuales que transforman la luz en corriente eléctrica, de tal forma que ésta es proporcional a la intensidad de luz recibida. Los PMT pueden llegar a conseguir factores de multiplicación de  $10^3$  a  $10^9$  mediante la emisión secundaria, por lo que pueden responder a niveles muy bajos de iluminación con un nivel de ruido aceptable. En cambio, su eficiencia cuántica está entre el 20 % y 30 %, siendo generalmente mayor para longitudes de onda entorno al azul y

menor entorno al rojo. Los PDA y PMT ofrecen una resolución temporal alta, pero baja resolución espacial [10].

Actualmente las tecnologías más utilizadas en el CO del corazón son las cámaras CCD y CMOS, ya que proporcionan una mayor resolución espacio-temporal que las tecnologías anteriormente mencionadas, debido al gran número de píxeles de los que disponen y a las altas tasas de adquisición de datos de las que son capaces [10]. Tanto los sensores CCD como los CMOS están fabricados con materiales semiconductores de metal-óxido (MOS) y estructurados en forma de matriz. Acumulan una carga eléctrica en cada celda de la matriz (o píxel) en proporción a la intensidad de luz que incide sobre ella [15].

La principal diferencia de funcionamiento entre estas dos tecnologías es que cuando el tiempo de exposición ha terminado, los sensores CCD (Figura 4) transfieren cada carga del píxel, mediante desplazamientos sucesivos y de forma secuencial, hacia una estructura de salida común, que transforma la carga a voltaje y lo entrega a la circuitería de la cámara donde la señal se digitaliza [15].



**Figura 4.** Esquema de funcionamiento de un sensor CCD. La mayoría de las funciones se llevan a cabo en la placa de circuito impreso de la cámara. Si la aplicación requiere algún cambio, se puede rediseñar la electrónica sin cambiar el sensor.

En cambio, en los sensores CMOS (Figura 5), los fotones que recibe cada celda son convertidos en carga eléctrica y en voltaje en la misma celda receptora, por lo que las celdas son independientes unas de otras [15].

Estas diferencias en las técnicas de lectura de datos tiene implicaciones significativas en la arquitectura del sensor y, por tanto, en sus capacidades y limitaciones [15].

Las principales ventajas de las cámaras CCD es que tienen un mayor rango dinámico (razón entre el nivel de saturación de los píxeles y el umbral por debajo del cual no captan señal), menor ruido y proporcionan una respuesta uniforme, es decir, un píxel sometido al mismo nivel de excitación de luz que sus

vecinos no presenta cambios apreciables. En cambio, las cámaras CMOS permiten utilizar mayores velocidades de adquisición, registrar sólo una región de interés, no presentan efecto “Blooming” (fenómeno por el cual un píxel que ha alcanzado la saturación empieza a ‘contagiar’ a sus vecinos) y tienen una alta eficiencia cuántica, es decir, con poca luz se puede conseguir un nivel de señal aceptable [15].

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Procedimiento quirúrgico y preparación del corazón perfundido aislado.

Todos los procedimientos se realizaron cumpliendo con las directivas Nacionales (RD1201/2005) y Europeas (86/609/EEC) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. La aprobación fue otorgada por el Comité de Bienestar Animal del Hospital Clínico San Carlos. Se utilizaron cerdos de 20-30 kg de peso. Se utilizó ketamina (20 mg/kg i.m.) como premedicación y se indujo anestesia general mediante propofol (6 mg/kg i.v.) y besilato de atracurio (0.2 mg/kg i.v.). Para el mantenimiento de la misma se utilizó besilato de atracurio (1.25 mg/kg/h i.v.), fentanilo (0.005 mg/kg/h i.v.) e isoflurano (2%). Se utilizó ventilación mecánica durante todo el procedimiento. La adecuación de la anestesia se controló mediante monitorización del ECG, del CO<sub>2</sub> expirado, de la saturación de oxígeno en sangre (pulsioxímetro) y de la temperatura rectal.[16;17]

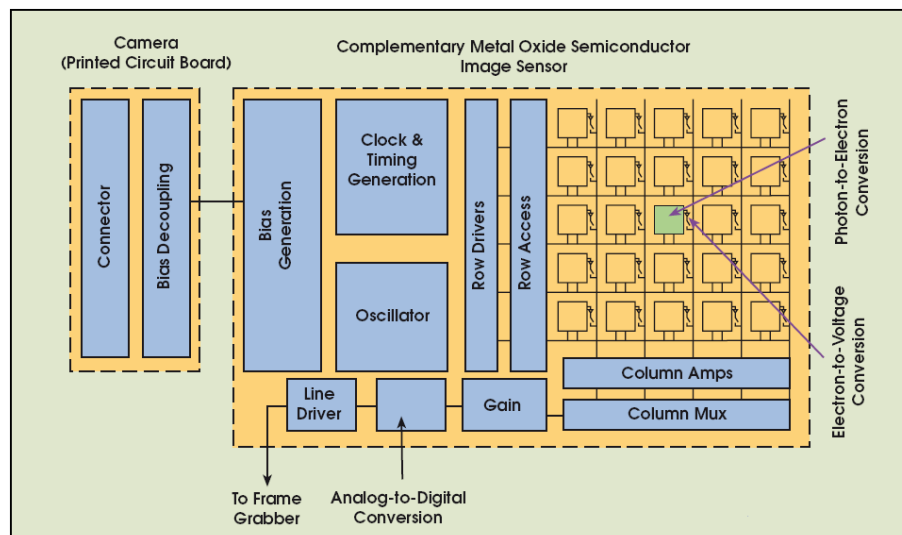
Una vez anestesiados los animales, los corazones fueron expuestos mediante una esternotomía medial y posteriormente explantados. Fueron introducidos inmediatamente en un recipiente con una solución de Tyrode frío (NaCl 130 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glucosa 5.6 mM, KCl 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM y albúmina 0.04 g/l) y se conectaron a un sistema de perfusión Langendorff mediante una cánula aórtica. Se perfundió solución de Tyrode o sangre oxigenada, a una temperatura de 37°C y con una presión de

perfusión media de 45-60 mmHg, a través de las arterias coronarias. Para mantener el Tyrode oxigenado (95% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>) y caliente (37°C) se utilizó un oxigenador extracorpóreo de neonatos (Lilliput 1 D901, Dideco, Sorin Group, Italia) calentado por un circuito cerrado de agua circulante, como se ha descrito en trabajos anteriores [16;17].

### B. Procedimiento de carga de tintes y desacoplador electromecánico.

Para la elaboración de la solución de carga de los tintes, previamente se preparó una solución stock de Pluronic F-127 (1 g de Pluronic F-127 disuelto en 5 ml de DMSO). A continuación, se inyectó la preparación de tinte potenciométrico (1 ml de la solución stock de Pluronic + 300 µl de di-4-ANBDQPQ (JPW-6003) disuelto en etanol (24.4 mg/ml + 30 ml de Tyrode) durante ~30 segundos dentro de la cánula aórtica. Finalmente, se inyectó lentamente (5-10 minutos) la solución de carga del tinte sensible al calcio (2 mg de Rhod-2 disueltos en 2 ml de DMSO + 2 ml de solución stock de Pluronic y 30 ml Tyrode).

El artefacto de movimiento debido a la contracción del corazón se eliminó utilizando blebbistatin. El blebbistatin es un inhibidor de miosina II y otras isoformas de la miosina, capaz de minimizar el artefacto de movimiento con mínimas repercusiones en la actividad eléctrica del corazón [18]. Para la elaboración de la solución de blebbistatin se disolvieron 2 mg de blebbistatin en 1 ml de DMSO y se almacenó a 4 °C en la nevera hasta su utilización. Según el volumen de la solución de perfusión utilizado se utilizaron las dosis necesarias para conseguir la molaridad deseada (en nuestros experimentos 10 µM). Para su utilización, se calentó y 5/6 se disolvieron en la solución de perfusión. El 1/6 restante se inyectó por la cánula aórtica durante ~20 minutos. La incorporación del blebbistatin a la preparación se hizo a oscuras, ya que la luz UV y parte del espectro visible (450-490 nm) inactivan el blebbistatin [19].



**Figura 5.** Esquema de funcionamiento de un sensor CMOS. La conversión carga-voltaje tiene lugar en cada píxel, y la mayoría de las funciones están integradas dentro del sensor.

C. Sistema de iluminación.

La preparación de corazón aislado se iluminó mediante 4 cabezas emisoras LED (LedEngin, Inc., Santa Clara, CA), 2 de ellas emitiendo “rojo profundo” (espectro centrado en 660 nm) para la excitación del tinte sensible a  $V_m$  y los otros 2 emitiendo luz verde (espectro centrado en 525 nm) para la excitación del tinte sensible a  $Ca_iT$ . Cada emisor LED suministra una potencia máxima de 10 W con una huella ultra pequeña (7x7x4,3 mm) (Figura 6A), proporcionando un flujo lumínico de ~425 lm con corrientes de 700 mA. Cada una de las cabezas emisoras está compuesta por 4 LEDs (Figura 6B). Se pueden consultar las especificaciones completas en la hoja de características suministrada por el fabricante.

Las cuatro cabezas emisoras LED se conectaron a dos fuentes (Cairn OptoLED, Faversham, Kent, UK, Figura 7). Cada fuente es capaz de controlar dos cabezas LED de forma independiente, utilizando un rango amplio de corrientes entre 0 y 5 amperios. Esta corriente puede ser establecida mediante un mando en el panel frontal o mediante un voltaje de control externo (de 0 a 10 V) por una entrada auxiliar. Cada canal dispone de un medidor de corriente (en A) o potencia (en W) que muestra los valores en el panel frontal.

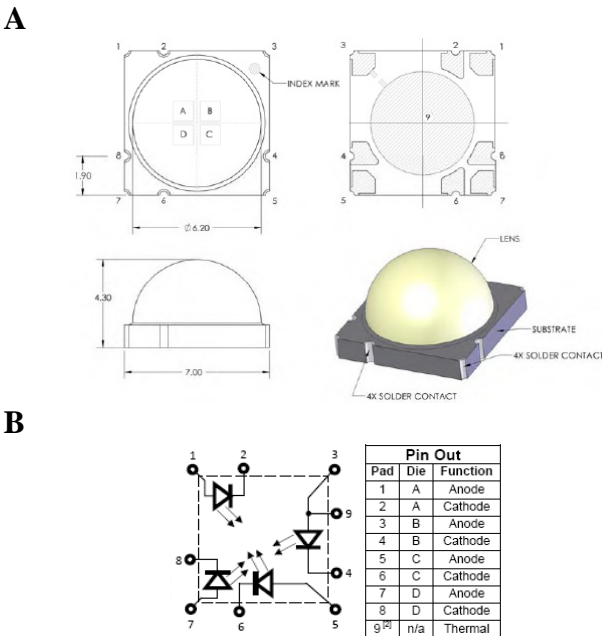
Estas fuentes permiten la activación de cada LED mediante entradas digitales TTL (0V o +5V nominal) con conexión BNC, lo que es idóneo para realizar la conmutación de los LEDs mediante una señal externa, en nuestro caso proveniente de la cámara CCD. Se pueden utilizar dos entradas independientes para conmutar los LEDs por separado o utilizar una única señal de control para conmutar los LEDs según el nivel lógico de la señal. La última opción fue la utilizada en nuestro sistema. Los tiempos de subida y bajada son menores a 100 nanosegundos, lo que garantiza una

iluminación adecuada durante los cortos periodos de adquisición de la cámara CCD (1-3.3 ms para tasas de adquisición entre 300 y 1000 fps).

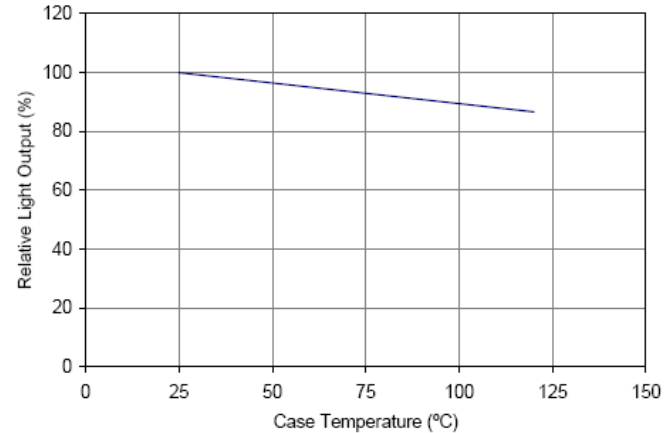
Una propiedad destacable de estas fuentes es que están provistas de un sistema de retroalimentación óptico, ya que, a pesar de que la salida de los LEDs tiende a ser más estable que otras fuentes, ésta también depende de la temperatura (Figura 8) que a su vez va variando dependiente del tiempo que lleve iluminando el sistema. En condiciones normales, la corriente que pasa a través del LED se ajusta utilizando un bucle de retroalimentación que la compara con un voltaje de control (proporcionado internamente o externamente por una entrada específica de la fuente). Cuando el sistema de retroalimentación óptico está activo, el voltaje de control ajusta la salida óptica del LED en vez de la corriente que pasa a través de él. El único inconveniente que presenta este sistema es que el tiempo de respuesta óptico para el ajuste es algo mayor, ~10  $\mu$ s, pero lo suficientemente rápido para nuestra aplicación.



**Figura 7.** Fuente de alimentación OptoLed junto dos emisores LED. Se observan dos paneles frontales independientes para el ajuste de la corriente suministrada a cada LED. Dispone de un interruptor para seleccionar entre iluminación continua o pulsada, y otro para seleccionar conmutación manual o controlada por una señal externa. También dispone de una pequeña luz verde para indicar que los LEDs están encendidos, y una luz roja para indicar que el sistema de realimentación no es capaz de evitar la saturación de los LED y es necesario disminuir la potencia suministrada manualmente.



**Figura 6. A:** Esquema dimensional (mm) de los emisores LED. **B:** Esquema eléctrico de un emisor LED, donde se observa la distribución de los 4 LEDs con sus respectivas conexiones de ánodos y cátodos.



**Figura 8.** Salida de luz relativa (%) vs. Temperatura (°C) para las cabezas emisoras verdes, según las especificaciones técnicas del fabricante. Nótase como a medida que aumenta la temperatura disminuye la salida de luz relativa.



#### D. Elementos ópticos. Filtros de excitación y emisión.

La excitación de los tintes tiene que ser lo más eficiente posible, por lo que es fundamental seleccionar la zona del espectro donde la densidad de potencia de los LEDs sea máxima (Figura 9A) pero eliminando la luz en las longitudes de onda en las que emiten los tintes, ya que estos emiten intensidades muy bajas, incapaces de competir con la luz residual de iluminación a las mismas longitudes de onda a las que ellos emiten. Por ello, para el correcto funcionamiento del sistema es clave el uso de filtros ópticos, tanto de excitación (acoplados a las cabezas LED), como de emisión (acoplado a la lente de la cámara CCD). A cada emisor LED se le acopló un filtro óptico paso banda de excitación (Chroma Technology Corp., Brattleboro, Vermont, USA). El filtro de excitación de  $V_m$  está centrado en 650 nm con un ancho de banda de 40 nm. El filtro de excitación de  $Ca_iT$  está centrado en 520 nm con un ancho de banda de 40 nm (Figura 9B).

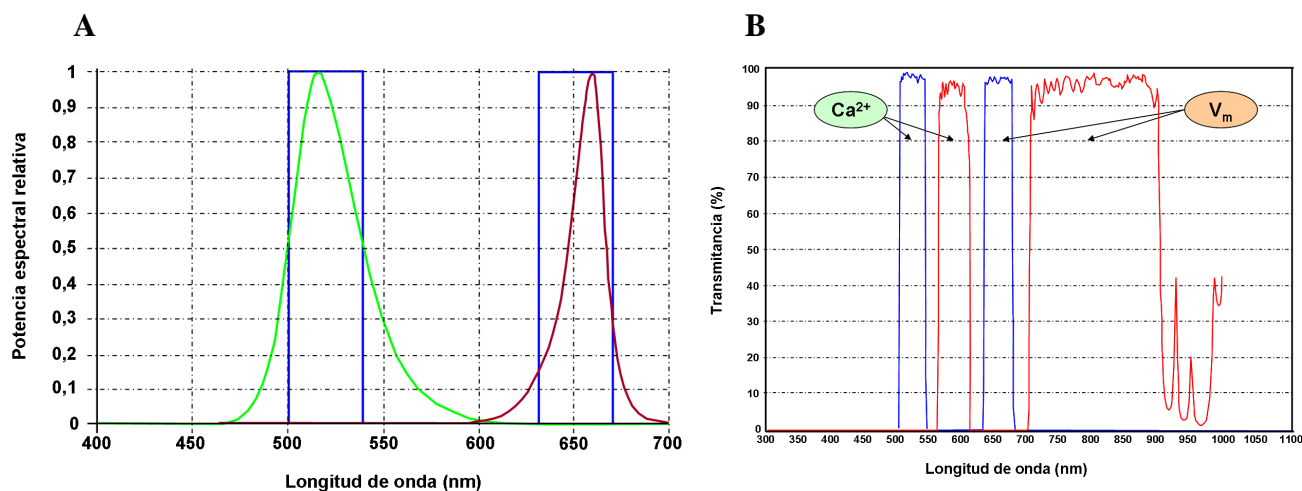
Se acopló una lente (Fuji Photo Optical Co., LTD, Saitama, Japón) sobre la cámara CCD para enfocar hacia el sensor la fluorescencia emitida por el corazón. Dicha lente tiene una apertura relativa máxima de 1:1.2, distancia focal de 6 mm, rango de iris de F1.2~F16. La lente dispone de anillos y tornillos de bloqueo para el iris y el enfoque, por lo que los ajustes no varían con el tiempo en el caso de experimentar vibraciones con la cámara.

A esta lente se le acopló un filtro óptico de emisión multibanda (Chroma Technology Corp., Brattleboro, Vermont, USA) para dejar pasar únicamente la fluorescencia emitida por los tintes. Las dos bandas de paso del filtro son  $585 \pm 20$  nm ( $Ca_iT$ ) y  $>700$  nm ( $V_m$ ) (Figura 9B).

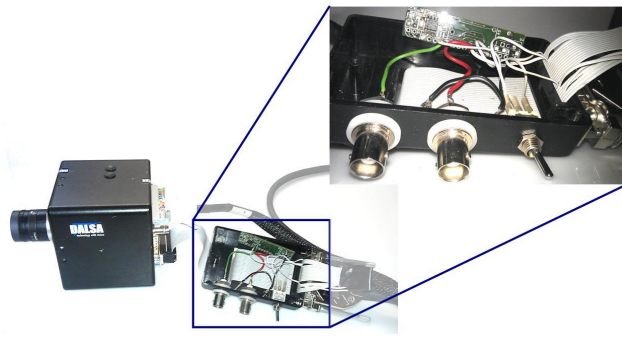
#### E. Fotodetector CCD y sincronismo con los LEDs.

Las películas de fluorescencia fueron adquiridas con una cámara CCD digital de 12 bits, modelo DALSA CA-D1-0128T (Teledyne DALSA, Waterloo, ON, Canadá), que tiene una resolución de 128x128 píxeles cuadrados con un tamaño de 16  $\mu$ m de lado cada píxel. Las grabaciones se realizaron en modo binning 2x2, que combina 4 píxeles para conseguir incrementar la sensibilidad (más brillo por píxel) a cambio de reducir la resolución a 64x64 píxeles. Esta característica es esencial dados los bajos niveles de fluorescencia relativa ( $\Delta F/F$ ) emitidos por los tintes. La cámara se conectó a una tarjeta de adquisición de datos PCI Road Runner (BitFlow, Inc., Woburn, USA), cuyo motor de acceso directo a memoria (DMA) transfiere los datos directamente a la memoria del sistema y cuyo puerto digital permite aceptar datos de hasta 32 bits, aunque sólo 12 fueron necesarios en este caso pues son los que proporciona nuestra cámara CCD.

Finalmente, uno de los componentes clave en nuestro sistema fue la construcción de un conmutador que posibilitó la activación de los LEDs rojos (excitación de tinte de  $V_m$ ) sólo en los frames impares y la activación de los LEDs verdes (excitación del tinte de  $Ca_iT$ ) sólo en los frames pares. El conmutador se implementó con un microcontrolador (Microchip 12F510). Dicho microcontrolador tiene como entradas la señal proveniente de la cámara que indica la obtención de un *valid frame*, la señal de *trigger* de la cámara y una alimentación de +5Vdc, conectadas mediante un cable plano. La salida consiste en dos señales TTL (a través de transistores 2N7000) invertidas una respecto a la otra, cuyos flancos de subida se utilizan para actuar como señal externa de conmutación de los LEDs. Dichas salidas están unidas a unos conectores BNC para poder conectarlas mediante cables BNC a las fuentes de los LEDs (Figura 10).

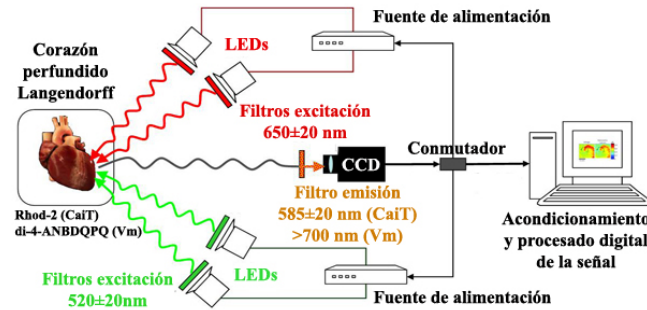


**Figura 9.** A: Potencia espectral relativa vs. Longitud de onda (nm) ( $T_c = 25$  °C) de los emisores LED verdes y los emisores LED rojos junto a sus respectivos filtros ópticos de excitación ideales (azul). B: Espectro de transmisión (Transmitancia vs. Longitud de onda) de los filtros ópticos de excitación (azul) y del filtro óptico de emisión multibanda (rojo).



**Figura 10.** Cámara DALSA conectada al conmutador de LED diseñado a medida. El interruptor permite elegir si se desea que los LEDs conmuten con la señal de *trigger* de la cámara, o con la señal de *valid frame*.

Así, en el presente proyecto se ha diseñado y desarrollado un sistema de CO cardíaco basado en iluminación LED a dos longitudes de onda diferentes (dos emisores LED por cada longitud de onda), utilizando un único fotodetector (cámara CCD). En la Figura 11 se muestra un esquema representativo de dicho sistema.



**Figura 11.** Esquema representativo de nuestro sistema de cartografiado óptico cardíaco. Consta de 4 emisores LED (2 verdes y 2 rojos profundos) de 10 W cada uno. A cada par de emisores LED se les suministra la corriente mediante una fuente de alimentación específicamente diseñada para ello con capacidad de realimentación para ajuste automático de los niveles de corriente. El dispositivo de adquisición de imágenes utilizado es una cámara CCD de 12 bits que se sincroniza frame a frame con los LEDs mediante un conmutador a medida. Para la excitación del Rhod-2 se acoplan a los LEDs unos filtros de excitación en el rango 520±20 nm y para la excitación del Di-4-ANBDQ PQ en el rango 650±20 nm. Para el registro de la fluorescencia emitida por el corazón se acopla a la lente de la cámara un filtro multibanda (585±20 nm y >700 nm).

#### F. Desarrollo del software.

La implementación del software se realizó con MATLAB® 2011b (versión 7.13). Se eligió dicho entorno de programación por su amplio soporte matemático, la incorporación de rutinas ya desarrolladas, la integración con dispositivos hardware, la facilidad de uso y la capacidad de funcionar en varios sistemas operativos (MS-Windows, Linux y Mac OS X). Para conseguir adquirir imágenes y videos de la cámara y de la tarjeta de adquisición fue necesario instalar el paquete de herramientas Image Acquisition Toolbox y el adaptador de MATLAB® para la cámara DALSA, permitiendo detectar el hardware automáticamente y configurar sus propiedades.

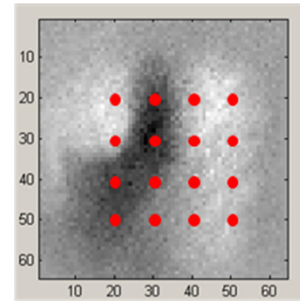
#### G. Análisis del nivel de fluorescencia de los tintes.

En el presente estudio se analizó la calidad de las señales registradas con las diferentes combinaciones de parámetros posibles (solución de perfusión, dosis de tinte y tasa de adquisición de imágenes). Como medida de calidad de las películas se calculó la fluorescencia relativa [5],  $\Delta F/F$ , en 16 píxeles uniformemente distribuidos en la imagen a modo de retícula 4x4 como se muestra en la Figura 12. Como se observa, se evitaron las zonas de los bordes por no tener habitualmente niveles de iluminación óptimos.

En cada uno de los 16 píxeles de cada película, la fluorescencia relativa se obtuvo como:

$$\Delta F/F(i, j) = \frac{F_{\max}(i, j) - F_{\min}(i, j)}{F_{\text{media}}(i, j)}$$

obteniendo posteriormente su valor medio y su desviación estándar, supuestas distribuciones gaussianas de los datos.



**Figura 12.** Distribución de los píxeles analizados (puntos rojos) en las películas de cartografiado óptico.

#### H. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos realizados se han llevado a cabo mediante el software IBM® SPSS® Statistics 19. La verificación de la hipótesis de normalidad en las muestras se comprobó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En las películas de  $V_m$  se comprobó si existían diferencias significativas de la fluorescencia relativa ( $\Delta F/F$ ) entre películas registradas con diferentes tasas de muestreo (con el nivel de iluminación óptimo para cada una de ellas) utilizando perfusión de Tyrode (transparente) mediante un One-Way ANOVA. En las películas de  $Ca_T$  se comprobó el efecto de los diferentes factores (tasa de muestreo, dosis del tinte y solución de perfusión: Tyrode/sangre) en  $\Delta F/F$ , mediante un Three-Way ANOVA. Los resultados son expuestos en la sección III.C y se recogen en la Tabla I y Figura 19, presentándose los datos como media ± desviación típica. Valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### III. RESULTADOS

#### A. Estructura del software y GUI.

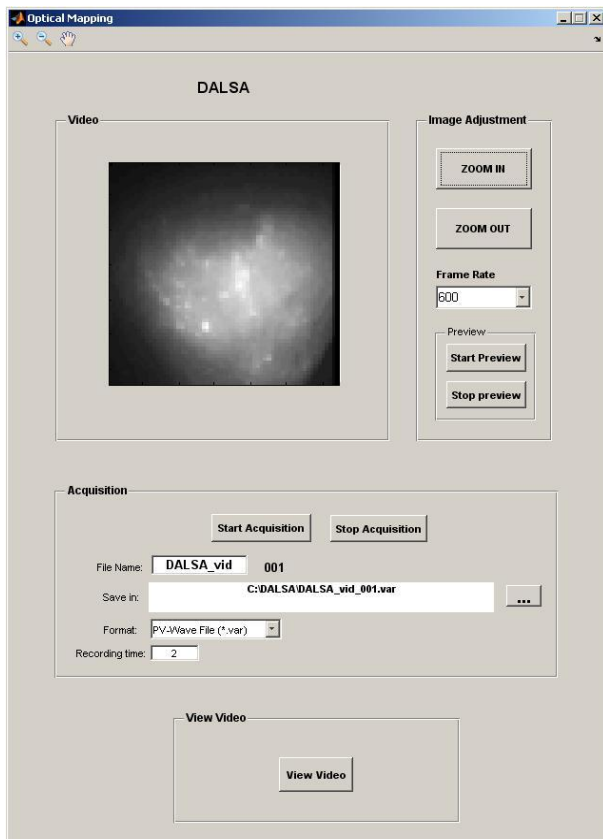
El software se divide en dos grandes bloques: 1) adquisición de datos y 2) acondicionamiento de los mismos. Dichos bloques permiten manejar el software con facilidad gracias a una interfaz gráfica de usuario.

El bloque de adquisición de datos está implementado en la función de Matlab *Optical Mapping()*. Al ser ejecutada aparece la pantalla principal que se muestra en la [Figura 13](#). La pantalla se divide en 4 paneles distintos, dependiendo de la funcionalidad.

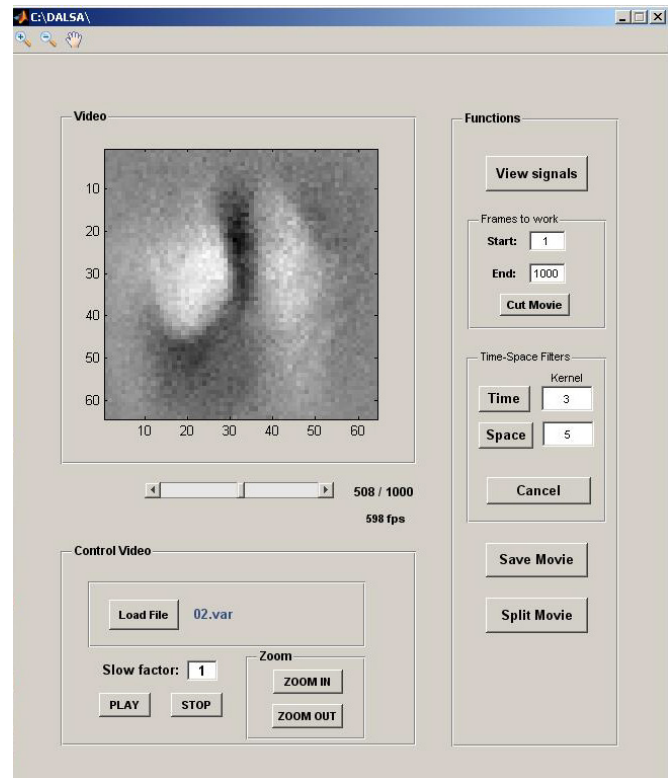
El panel principal es el de “Video”, donde se visualizan las imágenes que captura la cámara. A la derecha tenemos el panel “Image Adjustment”, el cual permite ajustar la tasa de muestreo y hacer una previsualización de la imagen adquirida con el nivel de zoom adecuado, para poder elegir adecuadamente la zona a grabar, comprobar si la iluminación es adecuada y enfocar la lente. Una vez ajustados todos los parámetros de la imagen, se puede comenzar la adquisición del video. Para ello se utiliza el panel “Acquisition” en el cual hay que indicar el nombre del archivo (al cual se le añade un número de secuencia automáticamente), el formato del video (\*.var o \*.mat), el directorio donde se va a guardar y el tiempo de grabación (duración de la película). Por último, el panel “View Video” nos dará acceso al bloque de acondicionamiento de los datos adquiridos.

Al pulsar el botón *View Video* se ejecuta la función de Matlab *View\_Video()*, donde está implementado el bloque de acondicionamiento de los datos adquiridos. Esta función genera una interfaz gráfica de usuario cuya ventana principal se muestra en la [Figura 14](#). Esta pantalla se divide en tres paneles, siendo el principal el de “Video” donde se visualiza la película de CO.

Para empezar el acondicionamiento de los datos, hay que dirigirse al panel de “Control Video”, desde el cual podemos importar una película que tenga un formato \*.var o \*.mat pulsando al botón Load File. Cuando la película esté cargada podemos reproducir y parar el video (PLAY, STOP), hacer que se vea más lento aplicándole un factor de ralentización (Slow factor) y ajustar el zoom (ZOOM IN/OUT). Además de todas estas opciones típicas de un reproductor, en el panel “Functions” se recogen una serie de funciones específicas para el acondicionamiento de películas de CO cardíaco. El primer botón *View Signals* permite seleccionar un píxel de la imagen y representar el nivel de fluorescencia recogido en dicho píxel frente al tiempo. Bajo dicho botón se encuentra el subpanel “Frames to work”, desde el cual podemos recortar la película de CO al intervalo de frames que nos interese procesar. El siguiente subpanel, “Time-Space Filters”, es de gran importancia para acondicionar las películas, ya que posibilita el filtrado temporal y/o espacial de las películas adquiridas. Es posible seleccionar el tamaño de ventana para filtrar especificándolo en las casillas de Kernel. Además es



**Figura 13.** Interfaz gráfica para la adquisición de los registros ópticos.



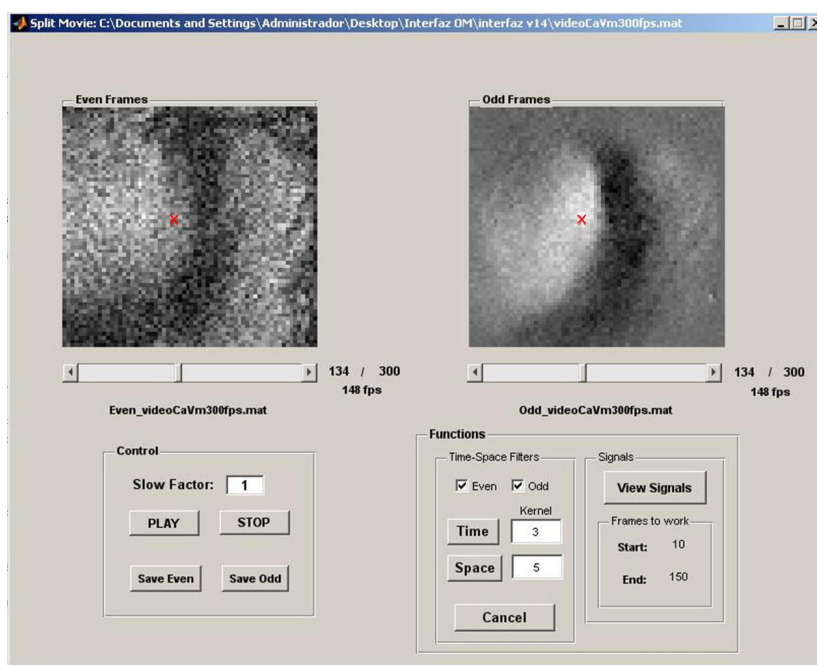
**Figura 14.** Interfaz gráfica para el acondicionamiento y visualización de los registros obtenidos.

posible eliminar los filtrados realizados pulsando el botón *Cancel*. Una vez aplicados los filtrados oportunos, podemos guardar la película de CO con el nombre de fichero que deseemos y en diferentes formatos (\*.var, \*.mat y \*.avi) pulsando el botón *Save Movie*.

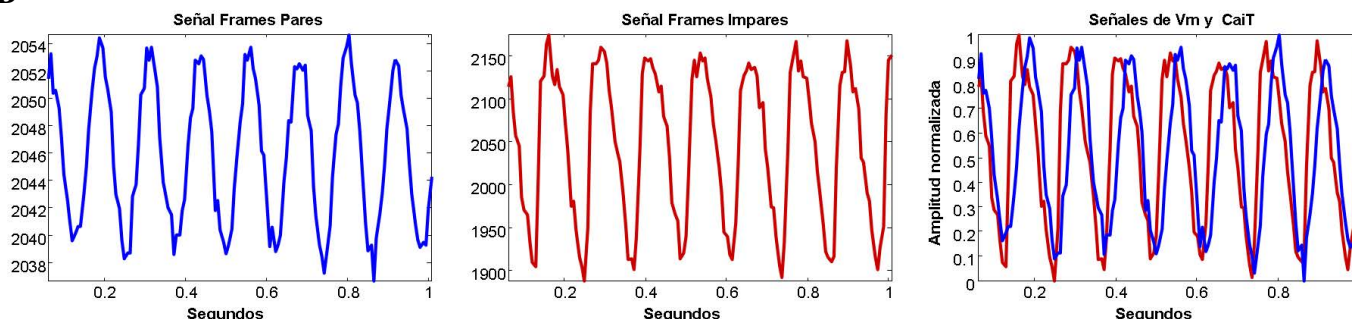
Finalmente, el botón *Split Movie* ejecuta la función *Split\_Movie()* donde está implementado un sub-bloque de acondicionamiento de los datos. Este sub-bloque sólo se utilizará si se han adquirido  $V_m$  y  $Ca_iT$  simultáneamente. Permite demultiplexar la película adquirida en dos películas independientes para analizar los dos parámetros registrados por separado (en nuestro caso los  $V_m$  y  $Ca_iT$ ). La pantalla principal de este sub-bloque se muestra en la **Figura 15A**, en la que se pueden diferenciar cuatro paneles distintos. En los paneles “*Even frames*” y “*Odd Frames*” se muestran las películas con las imágenes pares y con las imágenes impares respectivamente, por lo que cada una de las películas demultiplexadas corresponderá a los niveles de fluorescencia recogidos de los  $V_m$  y de los  $Ca_iT$ .

Desde el panel “*Control*” es posible iniciar la reproducción de las dos películas simultáneamente (botón *PLAY*), parar la reproducción (botón *STOP*) y añadir un factor de ralentecimiento (*Slow Factor*). Además, se puede guardar cada película de forma independiente, eligiendo el nombre y el formato (\*.var, \*.mat y \*.avi) que deseemos (botones *Save Even* y *Save Odd*). Desde el panel “*Functions*” se pueden realizar filtrados espaciales y/o temporales a cada película por separado (según la selección que hagamos en las casillas *Even* y *Odd*). Esta posibilidad de realizar filtrados independientes es realmente interesante ya que las películas de  $Ca_iT$  normalmente requieren aplicar filtros más agresivos que las películas de  $V_m$  debido a los extremadamente bajos niveles de fluorescencia que se obtienen en las primeras (**Figura 15B**). Pulsando el botón *Cancel* se eliminan todos los filtrados aplicados. Finalmente y como se muestra en la **Figura 15B**, si se pulsa el botón *View Signals* es posible visualizar la señal en cada píxel, mostrándose tres gráficas distintas:  $Ca_iT$ ,  $V_m$  y las dos superpuestas, permitiendo evaluar variables interesantes como el tiempo entre máxima pendiente de subida de las mismas, que da una idea del retardo de la dinámica del calcio respecto a la de los potenciales de acción.

A



B



**Figura 15. A:** Interfaz gráfica del módulo de *Split Movie*. La ‘x’ roja indica el píxel de la película que ha sido seleccionado para la visualización de su nivel fluorescencia. **B:** Figuras que aparecen tras pulsar el botón *View Signals* de la interfaz gráfica de *Split Movie*. En la gráfica de la izquierda se representa la señal de los frames pares, en la del medio se representa la señal de los frames impares y en la de la derecha se representan las dos señales simultáneamente con la amplitud normalizada. La señal azul corresponde a los  $Ca_iT$  y la señal roja a los  $V_m$ .



### B. Procesado digital de las películas.

El filtrado temporal y espacial se implementaron según describen Mironov et al [20]. El efecto de este tipo de filtrados en cuanto a mejora de la SNR y la distorsión que producen ya ha sido estudiado anteriormente [20], por lo que este trabajo no pretende llevar a cabo un análisis similar, sino solamente a nivel descriptivo.

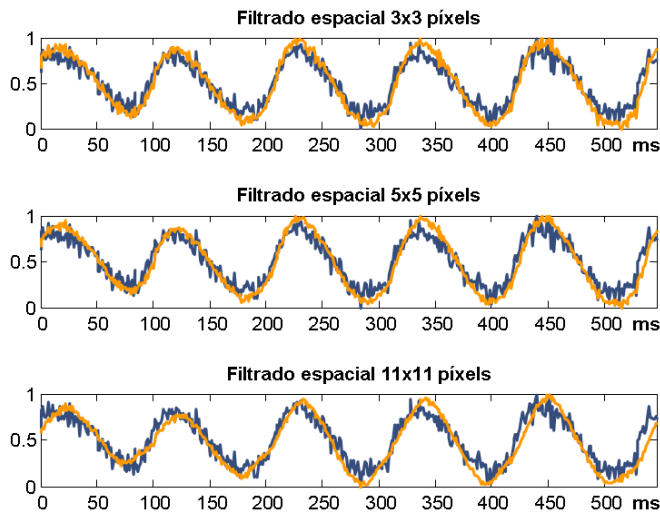
#### 1) Filtrado espacial.

Los coeficientes del filtrado espacial se implementaron utilizando una ventana triangular (Bartlett). El peso es máximo en el píxel central, y decrece linealmente hacia los bordes de la máscara de convolución, es decir:

$$w(i, j) = 1 - \sqrt{\frac{k^2 + l^2}{m^2}} \quad \text{para } k^2 + l^2 < m^2 \text{ y 0 el resto}$$

Donde  $m$  es el tamaño de la máscara de convolución en píxeles y  $-m/2 < k, l < m/2$ .

La [Figura 16](#) muestra el efecto de utilizar diferentes tamaños de kernel, pudiendo observarse como aumenta la distorsión a medida que la máscara de convolución va aumentando.

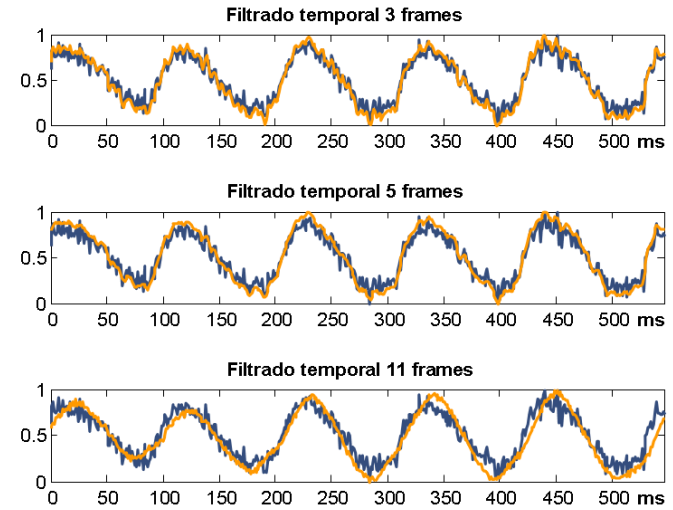


**Figura 16.** Señal de  $V_m$  registrada a 900 fps con perfusión de Tyrode. Las gráficas representan la fluorescencia normalizada frente al tiempo (ms). La señal original está representada en azul, las señales naranjas representan la señal filtrada espacialmente, aplicando diferentes tamaños de kernel espacial (3, 5 y 11 píxeles).

#### 2) Filtrado temporal.

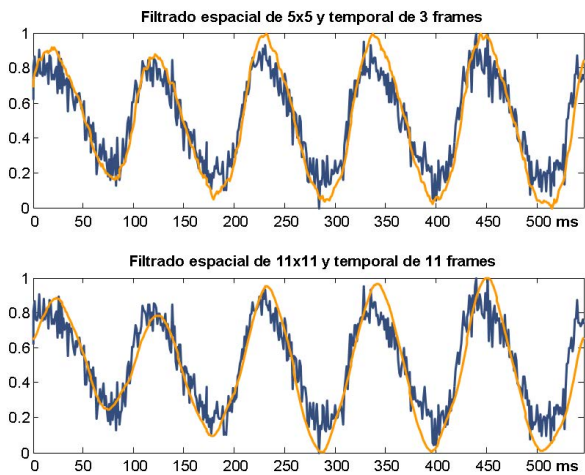
El filtrado temporal se implementó utilizando una ventana triangular similar a la del filtrado espacial pero con una única dimensión (tiempo). En la se muestran su efecto sobre la señal tras realizar un filtrado temporal con distintos tamaños de ventana (3, 5 y 11 frames). Como se puede observar, a tamaños de kernel más pequeños más se ajusta la morfología de la señal filtrada a la original. En cambio, al aumentar el

tamaño del kernel se reduce el ruido de alta frecuencia pero se distorsiona la señal, de manera similar a como pasaba con el filtrado espacial.



**Figura 17.** Señal de  $V_m$  registrada a 900 fps con perfusión de Tyrode. Las gráficas representan la fluorescencia normalizada frente al tiempo (ms). La señal original está representada en azul y las señales naranjas representan la señal filtrada temporalmente con diferentes tamaños de kernel (3, 5 y 11 frames).

Como se puede observar en la [Figura 17](#) (gráfica superior), tras aplicar un filtrado combinado (espacial de 5x5 píxeles y temporal de 3 frames) obtenemos una señal de alta calidad, eliminando el ruido y preservando la fase 0 de los potenciales de acción. En la [Figura 17](#) (gráfica inferior) se muestra la señal tras realizar un filtrado más agresivo, combinando un filtro espacial de 11x11 píxeles y un filtro temporal de 11 frames. La señal resultante tras aplicar dicho filtrado queda libre de ruido pero se aprecia cierta distorsión morfológica frente a la señal original lo que podría introducir una distorsión importante por ejemplo en la medición de tiempos de activación o duración del potencial de acción.



**Figura 18.** Señal de  $V_m$  registrada a 900 fps con perfusión de Tyrode. Las gráficas representan la fluorescencia normalizada frente al tiempo (ms). Las señales azules representan la señal original mientras que las naranjas representan las señales filtradas (Espacial 5x5 + Temporal 3 y Espacial 11x11 + Temporal 11).

### C. Niveles de fluorescencia relativa obtenidos con el sistema.

La metodología utilizada se ha expuesto anteriormente (apartado G de la sección II). Las películas de  $V_m$  obtenidas a diferentes tasas de muestreo no presentaron diferencias significativas en los niveles de fluorescencia relativa (one-way ANOVA,  $P = 0,811$ ) utilizando la misma dosis de tinte y con el mismo tipo de perfusión (Tyrode, transparente). De hecho, los niveles de  $\Delta F/F$  obtenidos en las películas de  $V_m$  a diferentes tasas de adquisición fueron buenos y prácticamente iguales como se observa en la [Tabla I](#). Esto es debido a que al aumentar el número de imágenes por segundo adquiridas, se aumentó simultáneamente la potencia suministrada por los LEDs para compensar la disminución del tiempo de exposición. Incluso a la tasa de adquisición más alta permitida por la cámara (900 fps) los LEDs sólo necesitaron suministrar 6W de los 20W que eran capaces de proporcionar.

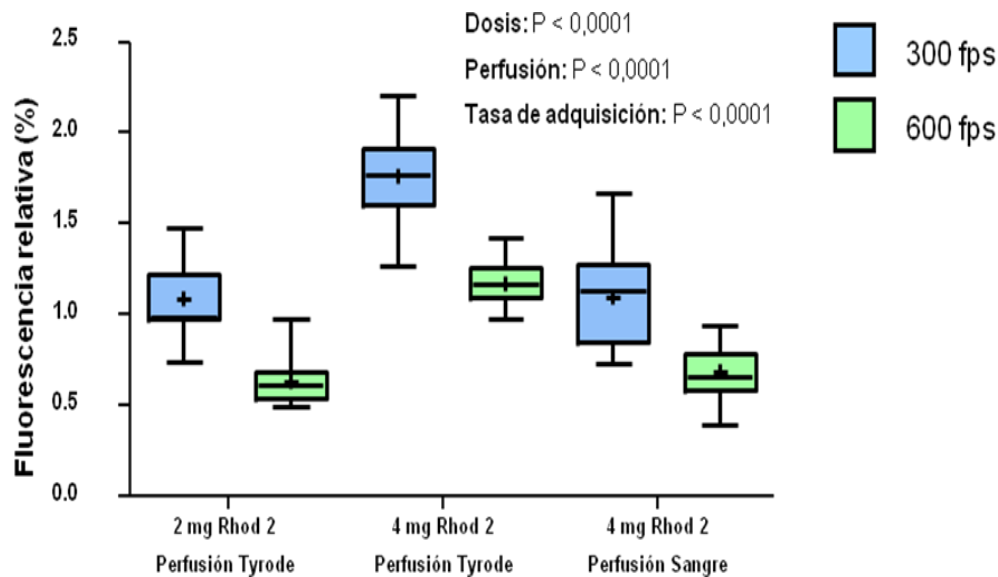
Esto indica que el nuevo tinte de potencial de membrana utilizado en este trabajo ofrece niveles de fluorescencia relativa óptimos incluso con bajos niveles de iluminación y a altas tasas de adquisición. Es obvio que si se hubiera mantenido la luz de excitación a un nivel constante,  $\Delta F/F$  hubiera disminuido al aumentar la tasa de adquisición como consecuencia de la disminución de los tiempos de adquisición por frame.

**Tabla I.** Efecto de la tasa de adquisición de imágenes sobre la fluorescencia relativa ( $\Delta F/F$ ) del tinte sensible a la señal  $V_m$  (di-4-ANBDQPPQ).

Tasa de adquisición (fps)	Potencia (W)	Fluorescencia Relativa (%)
300	< 5	$7,35 \pm 2,37$
600	< 5	$7,59 \pm 2,37$
900	6	$6,99 \pm 3,10$

Todas las películas fueron adquiridas con perfusión de Tyrode y la misma dosis de tinte. Los valores vienen dados como media  $\pm$  desviación típica (%). El efecto de la tasa de adquisición no fue significativo ( $P = 0,811$ )

En el caso de las mediciones de la fluorescencia relativa del tinte de  $Ca_iT$ , fue necesario suministrar la potencia máxima de los LEDs verdes de excitación (20 W), a pesar de lo cual los niveles obtenidos se quedaron lejos de ser óptimos. Se comprobó el efecto de los diferentes factores (tasa de adquisición de imágenes, dosis del tinte y solución de perfusión). Los valores de fluorescencia relativa obtenidos se muestran en la [Figura 19](#). El efecto de los 3 factores fue altamente significativo (3-way ANOVA). Así, el uso de perfusión con sangre en lugar de Tyrode y el aumento de la tasa de adquisición, disminuyeron significativamente  $\Delta F/F$  (ambos  $P < 0,0001$ ), mientras que el aumento de dosis de Rhod-2 de 2 mg a 4 mg, la aumentó significativamente ( $P < 0,0001$ ).



**Figura 19.** Efecto de la dosis (2 mg vs 4 mg), tasa de adquisición (300 fps vs 600 fps) y solución de perfusión (Tyrode vs sangre) sobre la fluorescencia relativa del tinte sensible a la señal  $Ca_iT$  (Rhod-2). Los tres parámetros mostraron tener una influencia altamente significativa ( $P < 0,0001$ )

#### IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los sistemas clásicos de CO cardíaco permiten el registro individual de  $V_m$  o  $Ca_iT$  con un único fotodetector, o su registro simultáneo con dos fotodetectores y un complejo sistema óptico auxiliar. El presente trabajo demuestra la viabilidad de un sistema de CO en corazón grande, para el registro simultáneo de  $V_m$  y  $Ca_iT$  con una única cámara CCD, iluminación LED y un sistema de conmutación a medida.

El sistema puede ser utilizado con solución de perfusión Tyrode para obtener señales de alta calidad, pero con el inconveniente de la edematización de la pieza. Puesto que se utiliza para  $V_m$  un tinte que emite en el infrarrojo cercano (menos atenuado ópticamente por la hemoglobina), el sistema permite trabajar con perfusión de sangre en lugar de Tyrode, limitando significativamente la edematización. Sin embargo, los bajos niveles de señal de  $Ca_iT$  obtenidos con sangre suponen un claro inconveniente. A la espera del desarrollo de tintes sensibles al  $Ca^{2+}$  intracelular con longitudes de onda de excitación y emisión más desplazadas hacia el infrarrojo, la utilización de mayores potencias LED para excitar el Rhod-2 y el uso de una cámara con mayor sensibilidad mejorarían las prestaciones del sistema de manera importante.

##### A. Utilidad del sistema y del software implementado.

Hasta ahora, en el Hospital Clínico San Carlos se utilizaban dos aplicaciones separadas para la adquisición y el condicionamiento de las películas de CO cardíaco (Road Runner 400 y Scroll respectivamente, del Dr. Sergey Mironov). En el presente proyecto se ha implementado mediante MATLAB® una única aplicación conjunta que permite la adquisición y el análisis de las películas, además de la demultiplexación de las mismas en el caso del registro de dos parámetros ( $V_m$  y  $Ca_iT$  en nuestro sistema). Gracias al extendido uso de MATLAB® y a la posibilidad de incorporar nuevas funciones y bibliotecas, se pueden integrar más módulos independientes fácilmente en nuestra aplicación para análisis de los registros obtenidos. Por ejemplo, detección de puntos singulares y películas de fase, representación de mapas de frecuencia dominante e índice de regularidad para análisis de ritmos fibrilatorios, y obtención de mapas de isócronas y de velocidad de propagación del frente de onda, así como mapas de duración del potencial de acción y refractariedad para análisis de ritmos estimulados o espontáneos no fibrilatorios. Muchos de ellos ya han sido previamente desarrollados por nuestro grupo [16;21] y en un futuro próximo serán integrados con la herramienta aquí descrita para conseguir una funcionalidad total en cuanto a 1) adquisición, 2) acondicionamiento y 3) análisis de las señales registradas.

##### B. Elección de los tintes.

Existen una gran variedad de tintes fotosensibles, cuyas moléculas están compuestas por un cromóforo que se adhiere a

la membrana de las células y desprende fotones cuando se produce un cambio en la célula (por ejemplo, un cambio en el potencial de membrana o en la concentración de calcio intracelular) mientras que es excitada con una determinada luz.

Como se ha visto, típicamente el más utilizado para  $V_m$  ha sido el di-4-ANEPPS, que ha sido utilizado con éxito para CO tanto en células cardíacas como en tejidos con Tyrode (solución transparente), pero su utilidad se ha visto limitada para la perfusión con sangre debido a la dispersión de la luz y a la alta absorción de los cromóforos y de la hemoglobina con longitudes de onda de excitación onda verdes [5]. Se ha probado que la utilización de longitudes de onda largas (cercasas al infrarrojo) tanto para emisión como excitación, puede minimizar este problema, permitiendo la perfusión con sangre e incluso mejorando el registro de capas profundas del tejido. Entre estos tipos de tintes se encuentran los tintes sintetizados y caracterizados en el laboratorio del Dr. Salama [21], los llamados Pittsburgh I-VIII, y más recientemente los tintes di-4-ANBDQPQ y di-4-ANBDQBS. Además, son compatibles con otros tintes y se obtiene una mejor calidad de señal en comparación con el di-4-ANEPPS cuando se utilizan tanto con Tyrode como con sangre [10]. Tienen la ventaja añadida de que el decaimiento de la señal emitida debido a la internalización del tinte es de 5 a 7 veces más lento que en el caso del di-4-ANEPPS [5].

La utilización de este tinte es de gran importancia para nuestro sistema de CO de corazones de cerdo perfundidos con sangre debido a que las longitudes de onda de emisión y excitación se encuentran en el infrarrojo cercano, permitiendo así el registro simultáneo de los potenciales transmembrana (di-4-ANBDQPQ) y transitorios de calcio (Rhod-2). Esto es posible ya que los dos tintes emiten en rangos de longitudes de onda diferentes, por lo que acoplando un filtro óptico multibanda en la lente de la cámara CCD se pueden registrar las dos señales “simultáneamente” cuando excitamos con luz LED, alternando entre 532 nm (verde, para el Rhod-2) y 650 nm (rojo profundo, para el di-4-ANBDQPQ). Esta combinación de tinte es ideal, puesto que el di-4-ANBDQPQ tiene su punto isobéptico en el verde (longitud de onda de excitación a la cual un cambio producido en el potencial transmembrana no produce ni una disminución ni un aumento de la intensidad de emisión), y por lo tanto no se registra señal de voltaje cuando se ilumina con luz verde, que es la que se utiliza para excitar el Rhod-2 [22].

##### C. Acondicionamiento de la señal. Filtrado.

El ruido es uno de los grandes enemigos de los registros de CO debido a los bajos niveles de fluorescencia relativa obtenidos habitualmente. Es por ello, que se hace especialmente importante el filtrado de las señales registradas.

En cuanto al filtrado espacial, fundamentalmente elimina el ruido asíncrono producido por el dispositivo de adquisición. Según Mironov et al. [20], un tamaño de kernel espacial de 5 es suficiente para obtener una SNR óptima con una mínima distorsión. Así, en la [Figura 16](#) se puede observar como al

aumentar el tamaño del kernel mejora la SNR, pero aumenta la distorsión, añadiendo un ligero desfase en el dominio del tiempo debido a la ponderación de los tiempos de activación de una zona del tejido más amplia.

El filtrado temporal elimina, entre otros, el ruido síncrono producido por el sistema de iluminación. Este ruido es uniforme en un frame, pero varía de frame a frame debido a las fluctuaciones del sistema de iluminación [20], aunque este ruido se ha minimizado con las nuevas tecnologías de iluminación LED y láser de alta estabilidad. Para filtrados temporales el tamaño del kernel no debería ser mayor de 6 frames para preservar las frecuencias menores de 130 Hz (dónde se encuentra el espectro de la señal útil). En la práctica, en nuestro laboratorio se suelen utilizar kernel de 3 frames o 5 si la señal es muy ruidosa. Otras aproximaciones como el filtrado de mediana pueden ser de utilidad en ciertas situaciones.

Así, el acondicionamiento de las señales registradas mediante una combinación de filtros espaciales y temporales es la opción adecuada a la hora de analizar las películas de CO cardíaco. Además puesto que las señales de calcio son más ruidosas que las de potencial de membrana debido a su menor fluorescencia relativa, nuestro sistema permite filtrar de manera individual ambas señales, pudiendo aplicar a cada una de ellas el filtrado que se estime más oportuno.

#### D. Niveles de fluorescencia obtenidos.

Como se observa en la [Figura 15B](#), en la [Tabla I](#) y [Figura 19](#), los niveles de fluorescencia relativa en las películas de  $\text{Ca}_i\text{T}$  son sustancialmente más bajos que en las películas de  $\text{V}_m$ . De hecho las películas de  $\text{V}_m$  se pudieron adquirir con sus LEDs de excitación (rojo profundo) muy lejos de proporcionar su potencia máxima (6W frente a los 20W máximos). Esto no fue así para las señales de  $\text{Ca}_i\text{T}$  para las que a pesar de iluminar con la potencia máxima disponible de los LEDs verdes (20W), no mostraron niveles de fluorescencia relativa que pudieran considerarse como buenos. Este hecho indica que la utilización de una cámara con mayor sensibilidad y eficiencia cuántica que la nuestra sería de interés para trabajar con las señales de  $\text{Ca}_i\text{T}$  con Tyrode y especialmente con sangre, donde los niveles de fluorescencia obtenidos son mínimos debido a la opacidad de la hemoglobina a las longitudes de onda utilizadas para excitación y emisión del Rhod-2. Además, con la utilización de una cámara con mejores prestaciones se haría posible el registro de las señales de baja amplitud, como por ejemplo las observadas en condiciones de estrés metabólico (por ejemplo fibrilación ventricular de larga duración con perfusión parada) o las observadas en la aurícula debido al bajo grosor de las paredes de la misma. Actualmente existen diversas compañías (iXon, Photometrics, SciMedia, etc.) que ofrecen cámaras CCD con resoluciones similares a la DALSA pero con tamaños de píxeles mayores, mayores sensibilidades y eficiencias cuánticas, y sobre todo mucho mejor comportamiento frente al ruido, ya que llevan incorporados sistemas de refrigeración que disminuyen la temperatura interna del dispositivo a  $-100^\circ\text{C}$ .

#### E. Limitaciones.

Aunque existen aproximaciones para obtener sistemas de CO panorámicos incluso en corazones grandes [23], nuestro sistema no está preparado para ello debido a la alta complejidad que conllevaría un sistema de este tipo que además permitiera registrar múltiples parámetros simultáneos. Por otra parte, las señales de  $\text{V}_m$  y  $\text{Ca}_i\text{T}$  registradas con Tyrode no son realmente simultáneas, ya que se adquieren en frames alternos. Sin embargo, trabajando con tasas de adquisición adecuadas esto no es un problema importante, ya que la interpolación entre muestras consecutivas será lo suficientemente robusta para que no se pierda información electrofisiológica de importancia.

#### AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. Julián Pérez Villacastín y a todos los integrantes de la Unidad de Arritmias del Hospital Clínico San Carlos su apoyo y cariño constantes. Al Dr. Javier Moreno por depositar su confianza en mí para la ejecución de este proyecto y contribuir a mi formación en el ámbito de la electrofisiología. A mi tutor y compañero Jorge G. Quintanilla, por su persistente guía tanto en el trabajo de la unidad como en la realización de este proyecto, motivando mi afán de superación cada día. Al Dr. Felipe Alonso Atienza y al Dr. José Luis Rojo por su continuo interés y ayuda en el proyecto, así como por concederme la oportunidad de la realización del mismo en el Hospital Clínico San Carlos. A toda mi familia y amigos por su comprensión, cariño y apoyo.

#### REFERENCIAS

- [1] J. Jalife, "And the beat goes on ... the beat goes on: organization and quasi-periodicity in ventricular fibrillation," *Cardiovasc. Res.*, vol. 99, no. 3, pp. 375-377, Aug.2013.
- [2] I. R. Efimov, V. P. Nikolski, and G. Salama, "Optical imaging of the heart," *Circ. Res.*, vol. 95, no. 1, pp. 21-33, July2004.
- [3] M. Warren, J. F. Huizar, A. G. Shvedko, and A. V. Zaitsev, "Spatiotemporal relationship between intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics and wave fragmentation during ventricular fibrillation in isolated blood-perfused pig hearts," *Circ. Res.*, vol. 101, no. 9, pp. e90-101, Oct.2007.
- [4] P. Lee, C. Bollensdorff, T. A. Quinn, J. P. Wuskell, L. M. Loew, and P. Kohl, "Single-sensor system for spatially resolved, continuous, and multiparametric optical mapping of cardiac tissue," *Heart Rhythm.*, vol. 8, no. 9, pp. 1482-1491, Sept.2011.
- [5] A. Matiukas, B. G. Mitrea, M. Qin, A. M. Pertsov, A. G. Shvedko, M. D. Warren, A. V. Zaitsev, J. P. Wuskell, M. D. Wei, J. Watras, and L. M. Loew,

- "Near-infrared voltage-sensitive fluorescent dyes optimized for optical mapping in blood-perfused myocardium," *Heart Rhythm.*, vol. 4, no. 11, pp. 1441-1451, Nov.2007.
- [6] Jorge G. Quintanilla, "Desarrollo de herramientas de análisis de potenciales cardiacos para investigación básica y clínica en arritmias. Modelado multiescala del corazón y sus aplicaciones en la práctica clínica." 2009.
- [7] P. Schaffer, H. Ahammer, W. Muller, B. Koidl, and H. Windisch, "Di-4-ANEPPS causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes," *Pflugers Arch.*, vol. 426, no. 6, pp. 548-551, Apr.1994.
- [8] S. Rohr and B. M. Salzberg, "Multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures: assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale," *Biophys. J.*, vol. 67, no. 3, pp. 1301-1315, Sept.1994.
- [9] S. M. Pogwizd, K. Schlotthauer, L. Li, W. Yuan, and D. M. Bers, "Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness," *Circ. Res.*, vol. 88, no. 11, pp. 1159-1167, June2001.
- [10] T. J. Herron, P. Lee, and J. Jalife, "Optical imaging of voltage and calcium in cardiac cells & tissues," *Circ. Res.*, vol. 110, no. 4, pp. 609-623, Feb.2012.
- [11] V. G. Fast, "Simultaneous optical imaging of membrane potential and intracellular calcium," *J. Electrocardiol.*, vol. 38, no. 4 Suppl, pp. 107-112, Oct.2005.
- [12] P. J. Del Nido, P. Glynn, P. Buenaventura, G. Salama, and A. P. Koretsky, "Fluorescence measurement of calcium transients in perfused rabbit heart using rhod 2," *Am. J. Physiol*, vol. 274, no. 2 Pt 2, p. H728-H741, Feb.1998.
- [13] D. L. Wokosin, C. M. Loughrey, and G. L. Smith, "Characterization of a range of fura dyes with two-photon excitation," *Biophys. J.*, vol. 86, no. 3, pp. 1726-1738, Mar.2004.
- [14] D. F. Albeanu, E. Soucy, T. F. Sato, M. Meister, and V. N. Murthy, "LED arrays as cost effective and efficient light sources for widefield microscopy," *PLoS. One.*, vol. 3, no. 5, p. e2146, 2008.
- [15] Dave Litwiller, "CCD vs. CMOS: Facts and Fiction," 2001.
- [16] J. Moreno, J. G. Quintanilla, A. Lopez-Farre, T. Archondo, R. Cervigon, P. Aragoncillo, E. Usandizaga, J. Silva, C. Rodriguez-Bobada, J. L. Rojo, N. Perez-Castellano, S. Mironov, L. Mont, P. T. Perez de, C. Macaya, and J. Perez-Villacastin, "Skeletal myoblast implants induce minor propagation delays, but do not promote arrhythmias in the normal swine heart," *Europace.*, vol. 12, no. 11, pp. 1637-1644, Nov.2010.
- [17] J. G. Quintanilla, J. Moreno, T. Archondo, A. Chin, N. Perez-Castellano, E. Usandizaga, M. J. Garcia-Torrent, R. Molina-Morua, P. Gonzalez, C. Rodriguez-Bobada, C. Macaya, and J. Perez-Villacastin, "K<sub>ATP</sub> channel opening accelerates and stabilizes rotors in a swine heart model of ventricular fibrillation," *Cardiovasc. Res.*, vol. 99, no. 3, pp. 576-585, Aug.2013.
- [18] L. M. Swift, H. Asfour, N. G. Posnack, A. Arutunyan, M. W. Kay, and N. Sarvazyan, "Properties of blebbistatin for cardiac optical mapping and other imaging applications," *Pflugers Arch.*, vol. 464, no. 5, pp. 503-512, Nov.2012.
- [19] D. Lang, M. Sulkin, Q. Lou, and I. R. Efimov, "Optical mapping of action potentials and calcium transients in the mouse heart," *J. Vis. Exp.*, no. 55 2011.
- [20] S. F. Mironov, F. J. Vetter, and A. M. Pertsov, "Fluorescence imaging of cardiac propagation: spectral properties and filtering of optical action potentials," *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, vol. 291, no. 1, p. H327-H335, July2006.
- [21] G. Salama, B. R. Choi, G. Azour, M. Lavasani, V. Tumbeev, B. M. Salzberg, M. J. Patrick, L. A. Ernst, and A. S. Waggoner, "Properties of new, long-wavelength, voltage-sensitive dyes in the heart," *J. Membr. Biol.*, vol. 208, no. 2, pp. 125-140, Nov.2005.
- [22] P. Lee, P. Yan, P. Ewart, P. Kohl, L. M. Loew, and C. Bollensdorff, "Simultaneous measurement and modulation of multiple physiological parameters in the isolated heart using optical techniques," *Pflugers Arch.*, vol. 464, no. 4, pp. 403-414, Oct.2012.
- [23] M. W. Kay, P. M. Amison, and J. M. Rogers, "Three-dimensional surface reconstruction and panoramic optical mapping of large hearts," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, no. 7, pp. 1219-1229, July2004.











